

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N° 12

Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines animales.

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Alice LAURENS

ANCIENNE ASSISTANTE DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ DE MARSEILLE
Née le 16 février 1918, à Saint-Martin-du-Var (Alpes-Maritimes).

Examineurs de la Thèse	{	MM. JEAN ROCHE, Professeur, Président.	{	Assesseurs
		M. NICLOUX, <i>Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg.</i>		
		M. MERCIER, <i>Professeur.</i>		
		M. DUBOULOZ, <i>Professeur.</i>		

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1942



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548806_0037

LAURENS (Alice). —

Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines animales. Lons-le-Saunier, M. Declume, impr., 1942. In 8°, 112 p.
Thèse, Pharm., Marseille, n° **12**

LAURENS (Alice). —

Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines animales. Lons-le-Saunier, M. Declume, impr., 1942. In 8°, 112 p.
Thèse, Pharm., Marseille, n° **12**

LAURENS (Alice). —

Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines animales. Lons-le-Saunier, M. Declume, impr., 1942. In 8°, 112 p.
Thèse, Pharm., Marseille, n° **12**

LAURENS (Alice). —

Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines animales. Lons-le-Saunier, M. Declume, impr., 1942. In 8°, 112 p.
Thèse, Pharm., Marseille, n° **12**

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Alice LAURENS

ANCIENNE ASSISTANTE DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ DE MARSEILLE

Née le 16 février 1918, à Saint-Martin-du-Var (Alpes-Maritimes).

Examineurs de la Thèse	{	MM. JEAN ROCHE, Professeur, Président.	}	Assesseurs
		M. NICLOUX, <i>Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg.</i>		
		M. MERCIER, <i>Professeur.</i>		
		M. DUBOULOZ, <i>Professeur.</i>		

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1942

Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines animales.

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Alice LAURENS

ANCIENNE ASSISTANTE DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ DE MARSEILLE

Née le 16 février 1918, à Saint-Martin-du-Var (Alpes-Maritimes).

Examineurs de la Thèse	{	MM. JEAN ROCHE, Professeur, Président.	{	Assesseurs
		M. NICLOUX, <i>Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg.</i>		
		M. MERCIER, <i>Professeur.</i>		
		M. DUBOULOZ, <i>Professeur.</i>		

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1942



PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL

Assesseur : F. MERCIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE
OLMER, GAUJOUX, AUBARET, COTTE

Chargés de cours honoraires : TIAN, BRUN.

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : Mme PEROL.

Professeurs :

Anatomie.....	CORSY
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale.....	CORNIL
Bactériologie.....	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie.....	RIMATTEI
Chimie médicale.....	ROCHE
Clinique chirurgicale.....	FIOLE
Clinique chirurgicale.....	BOURDE
Clinique exotique.....	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses.....	ROGER
Clinique médicale.....	AUDIBERT
Clinique médicale.....	MONGES
Clinique médicale.....	MATTEI
Clinique médicale infantile.....	GIRAUD
Clinique obstétricale.....	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique.....	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique.....	BREMOND
Clinique urologique.....	CHAUVIN
Histoire naturelle.....	N...
Histologie.....	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale.....	VIOLLE
Médecine légale.....	MOSINGER
Parasitologie.....	JOYEUX
Pathologie chirurgicale.....	MOIROUD
Pharmacodynamie et matière médicale.....	MERCIER
Pharmacie.....	VIGNOLI
Physiologie.....	MALMÉJAC
Physique.....	CHEVALLIER
Thérapeutique.....	POINSO
Professeur sans chaire.....	POURSINES
Professeur sans chaire.....	DUBOULOZ
Professeur sans chaire.....	SAUTET

Chargé de cours :

Clinique dermatologique VIGNE

Agrégés en exercice :

MM. PIÉRI	MM. FIGARELLA	MM. IMBERT
CARCASSONNE	PAILLAS	AUDIER
BERTHIER	ARNOUX	CHOSSON
BALANSARD	DELPHAUT	DOR
BRAHIC		RECORDIER

Agrégé libre :

M. QUINTARET

Chargé des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale..... DERRIEN

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique	SALMON
Chimie minérale.....	ARNOUX
Chimie organique.....	DUMAZERT
Clinique des maladies contagieuses.....	PERIOT
Médecine opératoire	DOR
Microbiologie.....	BOYER
Neuro-Chirurgie.....	ARNAUD
Obstétrique.....	CHOSSON
Pharmacodynamie aux Pharmaciens	DELPHAUT
Psychiatrie.....	ALLIEZ
Toxicologie	GUILLOT
Clinique gynécologique.....	FIGARELLA
Clinique chirurgicale infantile.....	R. IMBERT
Clinique stomatologique.....	ACHARD

A MON GRAND-PÈRE.

A MES PARENTS.

Avec toute mon affection.

A MA SŒUR.

A MON BEAU-FRÈRE.

A MON NEVEU.

A MA TANTE.

A MON MAÎTRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROCHE

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.

Avec ma profonde et respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. NICLOUX.

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'INSTITUT DE FRANCE.

MEMBRE ASSOCIÉ DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.

A MON JURY DE THÈSE.

A MON AMIE.

MONETTE DE LAROMIGUIÈRE.

A MES CAMARADES

DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE.

MEIS ET AMICIS.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
<i>INTRODUCTION</i>	13
PREMIÈRE PARTIE.	
Activateurs et inhibiteurs des phosphatases alcalines animales	15
A. — DONNÉES GÉNÉRALES SUR LES PHOSPHATASES ET LEUR CLASSIFICATION	18
B. — ACTIVATION ET INHIBITION DES PHOSPHATASES ALCA- LINES	19
1. — Activateurs	20
I. — Ion magnésium	20
II. — Ions métalliques divers	22
III. — Acide ascorbique	23
IV. — Acides aminés	24
2. — Inhibiteurs	24
I. — Ion phosphorique	24
II. — Ion arsénique	25
III. — Thiols (cystéine, glutathion)	25
IV. — Acides biliaires	26
V. — Fluorures alcalins	26
VI. — Oxalates alcalins	27
VII. — Glucosides	27
VIII. — Cyanures alcalins	27
IX. — Inhibiteurs divers	27
3. — Inactivateurs	28
C. — MODE D'ACTION DES ACTIVATEURS ET DES INHIBI- TEURS	29
D. — ACTION DES ACTIVATEURS ET DES INHIBITEURS SUR LES PHOSPHATASES ALCALES DE DIVERS ORGANES..	33
E. — ACTIVATION ET INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DES ESTERS PAR LES PHOSPHATASES ALCALES	35
Activateurs et inhibiteurs de la synthèse	36
F. — OBJET DU TRAVAIL	37

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles sur l'activation et l'inhibition des phosphatases alcalines	39
PLAN GÉNÉRAL DES RECHERCHES	39
CHAPITRE I. — Préparation et purification de la phosphomono-estérase et de la pyrophosphatase alcalines	40
A. — MATÉRIEL D'ÉTUDE ET DOSAGE DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE	41
1. Extraits enzymatiques bruts	41
2. — Substrats	42
3. — Dosage de l'activité phosphatasique	43
B. — PURIFICATION DES ENZYMES ET ESSAIS DE FRACTIONNEMENT	43
Phosphatases intestinales	43
Adsorption et élution (A)	43
a) Kaolin	43
b) Cholestérol et autres agents d'adsorption	45
Précipitation par l'alcool ou l'acétone (B)	46
Essais de séparation de la pyrophosphatase et de l'estérase intestinales par chauffage à des températures et à des pH différents (C). ..	48
Phosphatases osseuses	49
Phosphatases rénales	49
Phosphatases hépatiques	50
CONCLUSIONS DU CHAPITRE I	51
CHAPITRE II. — Les activateurs et les inhibiteurs de la phosphoestérase et de la pyrophosphatase alcalines des divers organes animaux	52
A. — ACTION DE L'ION MAGNÉSIUM	53
Enzymes de l'intestin	53
Lyoenzyme : Macération brute et enzymes purifiés	53
Desmoenzyme	54
Enzymes du foie	55
Enzymes du rein	56
Enzymes de l'os	57
Enzymes des globules blancs	57
B. — ACTION DES THIOLS (R—SH) ET DE LEURS PRODUITS D'OXYDATION (R—S—S—R)	58

I. — Phosphomonoestérases	58
Phosphomonoestérase intestinale	58
Cystéine	58
Cystine	59
Glutathion	60
Phosphomonoestérase hépatique	60
Cystéine	60
Glutathion	61
Phosphomonoestérase osseuse	61
Phosphomonoestérase rénale	62
II. — Pyrophosphatases	62
Pyrophosphatase intestinale	62
Cystéine	62
Cystine	63
Glutathion	63
Pyrophosphatase hépatique	64
Pyrophosphatase rénale	65
C. — ACTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DE L'ACIDE DÉHYDROASCORBIQUE	66
Enzymes intestinaux	66
Acide ascorbique	66
Acide déhydroascorbique	68
Acide ascorbique et thiols	70
Enzymes hépatiques	70
Phosphoestérase osseuse	71
Phosphoestérase rénale	72
Phosphoestérase sérique	72
D. — ACTION D'OXYDANTS ET DE RÉDUCTEURS DIVERS..	73
Oxydants	73
Eau oxygénée	73
Perborates alcalins	74
Ferryanure de potassium	74
Iode	75
Acide monoiodacétique	76
Réducteurs	77
Cyanure de potassium	77
Enzymes intestinaux	77
Phosphoestérase osseuse	78
Acide sulfhydrique	78
Sulfites alcalins	79
E. — ACTION DE L'ACIDE CHOLIQUE	79
Enzymes intestinaux	80
Phosphoestérase hépatique	80
Phosphoestérase osseuse	81
Phosphoestérase rénale	81

F. ACTION DES ACIDES AMINÉS	82
Phosphatases intestinales	82
Phosphatases hépatiques	83
Phosphoestérases osseuses	83
Phosphatases rénales	83
G. — ACTION DES OXALATES ET DES FLUORURES ALCALINS.	85
Enzymes intestinaux	85
Enzymes hépatiques	86
Phosphatases rénales	88
Enzymes des globules blancs	89
CONCLUSIONS DU CHAPITRE II	90
I. Action inhibitrice ou activatrice de divers corps..	90
II. Existe-t-il diverses phosphoestérases et diverses pyro-	
phosphatases alcalines	92
CHAPITRE III. — Action des activateurs et des inhibiteurs de	
l'hydrolyse des esters phosphoriques sur leur synthèse enzy-	
matique	94
Technique des essais	94
1. — Essai de synthèse type	95
2. — Action du pH	96
3. — Action de Mg^{+2}	96
4. — Action des réducteurs et des oxydants..	97
5. — Action d'autres corps divers	98
Comparaison entre la synthèse et l'hydrolyse des	
esters du point de vue de l'activation et de l'in-	
hibition	99
CONCLUSIONS DU CHAPITRE III	100
Conclusions générales	103
Bibliographie	107

INTRODUCTION.

L'activité des enzymes dans les cellules est fonction de la concentration de substances qui la favorisent ou l'inhibent. Il est très probable que le taux cellulaire des enzymes est peu variable, tandis que leurs activateurs ou leurs inhibiteurs peuvent se former ou être apportés par les humeurs selon un rythme inconstant. Aussi la connaissance de ces corps, revêt-elle une importance particulière, l'efficacité physiologique d'un système enzymatique étant fonction de l'équilibre entre ses activateurs et ses inhibiteurs.

Nous nous sommes proposés d'apporter une contribution à l'étude des corps susceptibles de modifier l'activité des phosphatases, enzymes libérant de l'acide orthophosphorique à partir de divers substrats, nous limitant dans ce travail au cas des phosphatases dites alcalines, en raison de leur pH optimum de 9,0-9,5. Ces enzymes sont à peu près universellement répandus dans les tissus des animaux et ils y présentent des différences de sensibilité aux activateurs et aux inhibiteurs particulières à des groupes d'organe, en sorte que l'on a pu envisager l'existence de plusieurs types de phosphatases alcalines. Mais il est permis de penser que ces différences, observées sur des préparations non purifiées, tiennent à la présence de produits naturels accompagnant les enzymes et dont on pourrait peut-être les séparer.

Le but de ce travail est d'étudier les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines d'un certain nombre d'organes animaux, brutes ou purifiées, et cela tant dans l'hydrolyse des esters phosphoriques et des pyrophosphates que dans la synthèse des premiers.

Afin d'exposer l'état actuel de cette question et de présenter la critique de travaux antérieurs, nous avons résumé dans une première partie les résultats déjà obtenus dans ce do-

maine, nos recherches personnelles étant présentées dans une seconde.

Nous avons fait appel, pour la rédaction de cette première partie à de nombreux mémoires originaux et aux mises au point de : ALBERS [1], COURTOIS [26], FOLLEY et KAY [36], LATREILLE [58], OPPENHEIMER [70]. Une partie importante de notre travail a été faite en collaboration avec Mlle S. de LAROMIGUIÈRE, dont la thèse de Doctorat en Pharmacie « Sur le système phosphatasique de l'intestin » décrit, de ce fait, certaines expériences figurant dans notre travail.

PREMIÈRE PARTIE.

**Activateurs et Inhibiteurs des Phosphatases
alcalines animales.**

PREMIÈRE PARTIE.

ACTIVATEURS ET INHIBITEURS DES PHOSPHATASES ALCALINES ANIMALES.

Dans les cellules, toutes les réactions sont catalysées par des enzymes, lesquels sont, de ce fait, l'un des éléments les plus importants du protoplasme et de sa vie. Mais la notion d'enzyme catalysant une réaction est un concept simple, élémentaire, ne répondant que de manière très générale au rôle biologique des corps de ce type. En effet l'activité d'un enzyme pur est susceptible d'être augmentée ou diminuée par des activateurs ou des inhibiteurs. Selon KAY [47], « il est impossible de retirer un enzyme d'un tissu sans détruire plus ou moins son activité. Les extraits des différents tissus doivent contenir en dehors de l'enzyme des quantités plus ou moins grandes de substances activatrices ou inhibitrices ». Il existe d'ailleurs, en dehors de celles-ci des substances non biologiques douées des mêmes effets. Ceci étant, il est facile de comprendre l'intérêt de l'étude des activateurs et des inhibiteurs, car on ne peut se représenter l'activité physiologique d'un système enzymatique sans leur intervention.

Une conception générale des modifications de l'activité des enzymes doit nécessairement être basée sur la constitution de celles-ci, constitution sur laquelle nous sommes encore insuffisamment renseignés. Les anciennes hypothèses, entre autre celle formulée au début de ce siècle par Gabriel BERTRAND et les importantes recherches expérimentales de WILSTÄTTER ont permis de se représenter un enzyme comme constitué par l'union de deux molécules. Selon la terminologie moderne d'Hans von EULER, on désigne sous le nom d'*holo-enzyme* le catalyseur biologique, lequel est constitué par l'union d'une molécule de *coenzyme*, porteur de groupements chimiques doués de l'activité catalytique, et d'une molécule d'*apo-enzyme* auquel se combine le substrat. Le coenzyme est un

corps de structure relativement simple, une sorte de groupement prosthétique, tandis que l'apoenzyme est une protéine spécifique ; c'est lui que WILLSTÄTTER désignait sous le nom de « support colloïdal ». Ce schéma de structure a pu être établi ou vérifié dans le cas de divers enzymes, en particulier du ferment jaune de WARBURG, de la catalase et de la peroxydase, le coenzyme du premier étant la lactoflavine ou vitamine B₂, et celui des deux autres la protohématine.

L'action des inhibiteurs et des activateurs peut s'exercer sur le coenzyme ou sur l'apoenzyme : elle se manifestera alors selon des modalités diverses, dont on trouvera la description dans diverses mises au point (BERSIN [14], COURTOIS [26], FLEURY [35]). On désigne sous le nom d'activateurs ou d'inhibiteurs *absolus* ceux dont les effets s'exercent indépendamment de la concentration en substrat dans le milieu et l'on admet qu'ils se combinent au coenzyme, dont ils augmentent ou diminuent l'activité catalytique. Quant aux activateurs ou inhibiteurs dits « concurrents » ils modifient l'affinité de l'apoenzyme pour le substrat. Dans le cas particulier des inhibiteurs, le mieux étudié, on admet qu'il existe une véritable concurrence entre le substrat et l'inhibiteur pour se fixer sur l'apoenzyme. Cette conception est nécessairement hypothétique car la structure des apoenzymes, comme celle de toutes les protéines est encore très mal connue et il est possible qu'une modification de l'enzyme pour le substrat ne soit en aucun cas le fait d'une « concurrence », une diminution ou une augmentation de l'affinité pouvant tenir à une modification de la réactivité du groupement auquel se combine le substrat provoquée par le blocage d'un groupement fonctionnel voisin. Un très récent travail de CLOETENS [22], faisant suite à diverses observations montrant l'action couplée des divers activateurs, apporte dans l'activation par divers ions métalliques un point de vue nouveau, le métal fixé étant un constituant de l'enzyme et se combinant à un groupement spécifique de celui-ci.

Nous proposant d'étudier l'activation et l'inhibition des phosphatases alcalines, nous examinerons tout d'abord l'état actuel de nos connaissances à ce sujet dans la première partie de notre travail.

A. — Données générales sur les phosphatases et leur classification.

Dès 1907, SUZUKI, YOSHIMURA et TAKAISHI ont mis en évidence dans les céréales un enzyme hydrolysant la phytine, ester hexaphosphorique de l'inositol. On a depuis lors donné le nom général de *phosphatase* à celui-ci et à tout enzyme dont l'activité libère de l'acide orthophosphorique.

Les phosphatases, très répandues chez les animaux et les végétaux, ont été classées par FOLLEY et KAY [36] selon leurs propriétés, en particulier selon leur activité préférentielle sur l'isomère α ou β de l'acide glycérophosphorique et les modalités de leur action sur celui-ci. Cette classification peut être ainsi schématisée.

Il existe cinq grandes classes de phosphatases agissant sur un type de substrat particulier et une sixième dans laquelle on a rangé des enzymes présumés actifs sur un seul substrat ou sur un groupe d'esters. On distingue :

I. — Les *phosphomonoestérases*, hydrolysant les monoesters de l'acide orthophosphorique, dont on distingue quatre types selon leur pH optimum d'action, leur sensibilité à l'ion Mg^{++} et leur affinité préférentielle pour l'un des isomères de l'acide glycérophosphorique. Ce sont : la phosphomonoestérase A_1 (os, rein, intestin), de pH optimum 9,0-9,5, activée par Mg^{++} , hydrolysant préférentiellement le β -glycérophosphate de sodium ;

La phosphomonoestérase A_2 (foie, rein, rate, prostate), de pH optimum 5,0-5,4, insensible à Mg^{++} dans les tissus animaux, plus active sur le β -glycérophosphate de sodium que sur l' α ;

La phosphomonoestérase A_3 (foie, rein, hématies, bactéries, champignons, végétaux verts), de pH optimum 3,8-4,2, inhibée par Mg^{++} , probablement plus active sur l' α -glycérophosphate de sodium que sur le β ;

La phosphomonoestérase A_4 (hématies, levures), de pH optimum 5,5-6,2, activée par Mg^{++} , hydrolysant préférentiellement l' α -glycérophosphate de sodium.

On désigne en général l'enzyme A_1 sous le nom de phosphatase alcaline et les enzymes A_2 et A_3 sous le nom de phosphatases acides.

II. Les *phosphodiesterases*, actives sur les diesters de l'acide orthophosphorique à partir duquel elles libèrent un ol et un ester orthophosphorique. Le dédoublement d'un diester exige l'action successive de la diestérase, puis de la monoestérase. On les rencontre dans les tissus animaux et les venins.

III. Les *pyrophosphatases*, hydrolysent les pyrophosphates et les esters pyrophosphoriques. Elles sont présentes dans tous les organes animaux et végétaux. Il en existe trois types, dont le pH optimum respectif est de 3,8, 5,2 et 8, également activables par Mg^{++} .

IV. Les *métaphosphatases* transforment les sels de l'acide métaphosphorique en orthophosphates.

V. Les *phosphoamidases* libèrent l'acide orthophosphorique de ses amides. La plus connue est celle agissant sur la phosphocréatine.

VI. Les *phosphatases spécifiques d'un substrat ou d'un petit groupe de corps*. On a décrit une *phytase*, dédoublant l'ester hexaphosphorique de l'inositol, une *hexosediphosphatase*, spécifique de l'acide fructosediphosphorique, une *lécithase*, une *nucléotidase* et une *adénylpyrophosphatase*. Il est difficile, pour la plupart de ces enzymes, d'accepter sans réserve leur individualité. Pour l'un de ceux dont elle fait le moins de doute, l'adénylpyrophosphatase, JACOBSEN [44] a montré que l'on peut obtenir à partir du foie des Mammifères des préparations inactives sur les pyrophosphates et sur les monoesters phosphoriques et dédoublant l'adénylpyrophosphate de sodium en acide adénosinediphosphorique et orthophosphorique. Ces faits ont été confirmés par BARRENSCHEEN et LANG [10], selon lesquels l'enzyme spécifique serait inhibé par Mg^{++} . Toutefois SATOH [79] estime à la suite de ses recherches qu'il n'existe pas d'enzyme hydrolysant les adénylpyrophosphates et que ceux-ci sont dédoublés dans les tissus par l'action combinée d'une pyrophosphatase et d'une phosphomonoestérase.

B. — Activation et inhibition des phosphatases alcalines.

La phosphomonoestérase A_1 ou phosphatase alcaline est susceptible d'être activée ou inhibée par de nombreux corps à son pH optimum (9,2). Nous examinerons successivement les principaux d'entre eux, nous limitant dans ce paragraphe à

une étude d'ensemble de leur action ; le mécanisme de celle-ci et sa diversité selon l'origine des enzymes devant être étudiés dans les paragraphes suivants.

I. ACTIVATEURS.

I. Ion magnésium. — Dès 1927 ERDTMANN [31] a établi que les sels de magnésium exercent un effet activateur marqué sur la phosphatase rénale, cet effet étant variable selon le taux de Mg^{++} .

JENNER et KAY [46], reprenant ces premières recherches, ont constaté qu'il existe une concentration optima en cet ion. Si l'on enrichit le milieu d'hydrolyse en sulfate de magnésium jusqu'à la concentration $M/1000$ environ, l'activité enzymatique (phosphatase rénale) augmente progressivement en fonction de la richesse en magnésium. Entre $M/1000$ et $M/500$ il n'en est plus de même, l'activation est maxima ; elle diminue aux concentrations supérieures à $M/500$ et l'on observe même une inhibition à $[SO_4 Mg] = M/50$ et au-dessus. Il existe donc une *concentration activatrice optima* en Mg^{++} dont la valeur indiquée ci-dessus n'est pas absolument constante et dépend de conditions diverses que nous examinerons plus bas (1). Ces faits ont été retrouvés par ROCHE et BULLINGER [72], ROCHE et COLLET [74] pour la phosphatase des os chez divers poissons osseux et cartilagineux.

L'activation par le magnésium n'est pas quantitativement identique dans tous les organes et, pour chacun de ceux-ci, elle varie selon les conditions d'extraction. BAMANN, RIEDEL et DIEDERICHs [8] ont constaté que les produits d'extractions aqueuses successives du rein, du foie deviennent de moins en moins activables par Mg^{++} . Un traitement rapide des organes par l'eau glacée permet d'obtenir l'enzyme le plus sensible à Mg^{++} .

L'effet activateur de cet ion se manifeste sur la phosphatase A_1 de divers organes, sur celle des os (ERDTMANN [31] ; ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [75]), du foie (BAMANN et DIEDERICHs [5]), du rein, de l'intestin (BODANSKY [15]), du cerveau (GEDRANGOLO [21]), du placenta (CATTANEO, GABRIELLI et SCOZ [20]), des hématies (ROCHE et BULLINGER [73]). Toutefois cer-

(1) On adopte en général pour exprimer la concentration en activateurs ou en inhibiteurs une notation logarithmique proposée par JENNER et KAY, à savoir $qMg = -\log [Mg]$; par exemple $SO_4Mg M/1000$ correspond à $qMg = 3$.

tains auteurs ne l'ont pas retrouvée. C'est ainsi que BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [11] considèrent avec HOMMERBERG [39] l'enzyme de l'os comme insensible à Mg^{++} .

Cette action n'est pas limitée à la phosphomonoestérase A_1 d'optimum alcalin ; elle se manifeste aussi sur la pyrophosphatase active dans la même zone de pH (BAMANN et SALZER [9] ; MUNEMURA [68]). Pour BAMANN et HEUMÜLLER [6], elle est trois fois moindre que sur la phosphomonoestérase (foie de Porc). L'activation forte par l'ion Mg^{++} paraît être un caractère particulier de la phosphatase alcaline, l'enzyme A_4 agissant en milieu neutre ou très faiblement acide étant peu activé par lui, l'enzyme A_2 , de pH optimum 5,0 lui étant insensible et la phosphomonoestérase A_3 , agissant à pH = 3,4 étant inhibée par lui. Selon BARRENSCHEEN et LANG [10] l'adénylpyrophosphatase serait inhibée par Mg^{++} .

Pour CLOETENS [23], il pourrait exister dans les organes animaux deux phosphomonoestérases A_1 se distinguant, entre autres, par leur sensibilité à Mg^{++} . L'une d'elles, dite « phosphatase alcaline I », serait inactive en l'absence de cet ion, tandis que la « phosphatase alcaline II » aurait simplement son pouvoir hydrolytique renforcé par lui. L'inégalité des effets des sels de magnésium sur les enzymes extraits des divers organes proviendrait du mélange de ces deux phosphatases alcalines en proportions diverses dans les uns et les autres.

Il n'existe pas d'étude systématique de l'influence de Mg^{++} sur l'action synthétisante des phosphatases alcalines. Au cours d'une revue sur ces enzymes, KAY [36] signale incidemment que des expériences non publiées lui ont permis de conclure à une absence d'action nette sur la formation des glycérophosphates par les enzymes intestinal ou rénal *in vitro* dans un milieu renfermant des phosphates minéraux et du glycérol. Du point de vue physiologique il est certain que le magnésium est un activateur de l'utilisation cellulaire des glucides et de leurs dérivés ; il intervient probablement dans les processus de phosphorylation que comporte celle-ci, à telle enseigne qu'on le considère comme un constituant du système cozymatique. Toutefois il n'a pas été possible jusqu'ici de reproduire *in vitro* les réactions de phosphorylation des oses dans des systèmes chimiquement définis ; aussi le rôle biologique de l'ion magnésium dans celles-ci est-il incomplètement connu. Les recherches de LOHMANN, de von EULER ont néanmoins

permis de préciser que le magnésium est un activateur de la phosphorylation des glucides par l'intermédiaire de l'acide adénylpyrophosphorique, mais sans agir nettement sur la formation ou la décomposition de ce corps ; il faciliterait la phosphorylation du glucose aux dépens de celui-ci.

II. *Ions métalliques divers.* — C'est dans la série des métaux tels que le manganèse, le fer, le cobalt que l'on a pu trouver des activateurs de la phosphomonoestérase A_1 , et encore leurs effets paraissent-ils inconstants, ce qui, pour CLOETENS [22] s'expliquerait par le fait qu'ils peuvent se remplacer les uns les autres comme constituant du coenzyme.

Mn^{++} est considéré par HORII [40] comme activateur ou inhibiteur selon le substrat, tandis que pour TANNHÄUSER, REICHEL et GRATTAN [85] il serait toujours activateur de la phosphomonoestérase A_1 dans le sérum. Selon ALBERS [2], ce phénomène ne pourrait pas être retrouvé avec des préparations enzymatiques (rein) purifiées. Mais CLOETENS [24], BARMANN [4], MASSART et DUFAY [63] ont simultanément obtenu en 1939 et en 1940 des résultats permettant d'affirmer l'action activatrice de Mn^{++} . Pour le premier de ces auteurs, cette action est telle que le manganèse doit être considéré comme un constituant de l'enzyme et pour le second, Mn^{++} est un activateur plus puissant que Mg^{++} (activations maxima observées : avec $Mg^{++} = 8.800$ p. 100 et avec $Mn^{++} = 25.000$ p. 100). Ces résultats positifs ont été obtenus avec des préparations provenant de foie, de rein, de rate, de levure.

Il est probable que Fe^{++} , Co^{++} et Ni^{++} peuvent avoir une action activatrice, toutefois beaucoup plus modérée (MASSART et VANDENDRIESSCHE [64] ; TANNHÄUSER et collaborateurs [85]), bien que pour HORII [40] et MORII [67] Fe^{++} puisse se comporter comme inhibiteur. Sans doute conviendrait-il d'entreprendre des expériences en présence de ces ions à diverses concentrations pour mieux définir leurs effets, car les métaux lourds sont des inhibiteurs généraux des enzymes au dessus d'une certaine concentration. Par ailleurs des essais faits sur des préparations non purifiées ont dans le cas présent peu de signification, car les métaux étudiés peuvent agir en catalysant une réaction détruisant un inhibiteur ($2 SH \longrightarrow S-S + 2 H$).

En ce qui concerne Zn^{++} , HORII [40] le considère comme activateur de la pyrophosphatase. De récentes expériences de HOVE, ELVEHJEM et HART [41] indiquent que Zn^{++} et les aci-

des aminés, peuvent exercer une action activatrice couplée sur l'enzyme A_1 de l'intestin. Une préparation de muqueuse intestinale dialysée est inhibée par Zn^{++} ; elle est activée faiblement par de l'alanine, mais fortement en présence du couple : alanine + Zn^{++} , comme si le zinc exerçait un effet activateur uniquement en présence d'acides aminés. De toute manière, l'analogie de propriétés du zinc et du manganèse et leur comportement vis-à-vis de la phosphatase A_1 méritent d'être soulignés. Pour CLOETENS [22], le zinc serait un constituant de la phosphatase du sérum et, pourrait être remplacé par d'autres métaux (Mn, Co entre autres, dans les phosphatases alcalines des autres organes. La présence d'un métal dans le co-enzyme ressort également de l'étude d'ensemble récente poursuivie par MASSART et DUFAY [63] sur l'action des cyanures et des fluorures alcalins.

Enfin l'action de Ca^{++} est controversée, mais probablement nulle. Pour MUNEMURA [68] ; BAMANN, RIEDEL et DIEDERICH [7], cet ion est indifférent ; pour KEESER [49] il serait antagoniste de Mg^{++} en raison de l'action inverse de ceux-ci sur la stabilité des colloïdes protéiques ; pour KUWABARA [57], la phosphatase A_1 serait activée par Ca^{++} dans les cals de fracture.

L'action de ces ions est en général très différente sur la phosphomonoestérase et sur la pyrophosphatase. BAMANN et HEUMÜLLER [6] ont pu observer dans le foie de porc que Fe^{++} et Ni^{++} activent plus la première que la seconde. Quant à Mn^{++} , activateur énergétique de l'estérase, il est sans action sur la pyrophosphatase (BAMANN [4]).

III. *Acide ascorbique*. — Les effets de ce corps sont incertains. Pour EULER et SVENSON [34] il est inhibiteur de l'enzyme A_1 de l'intestin de porc et il en serait de même de celle du rein pour PYLE [71]. En revanche EULER et SVENSON [34] ont observé une activation de la phosphorylation du glucose par la levure de bière, mais ce fait peut tenir à une modification du potentiel d'oxydoréduction et non à un effet spécifique de la vitamine C. Celui-ci aurait été observé par TANNHAÜSER, GRATTAN, MADDOCK et REICHEL [85] sur la phosphatase A_1 du sérum. Bien que les observations de ces auteurs soient nombreuses, leur exactitude paraît contestable. Leurs résultats sont tenus pour inexacts par KING et DELORY [51], qui les considèrent comme relevant d'erreurs matérielles.

ALBERS [1], reprenant ces expériences sur la phosphatase A_1 du rein purifiée n'a pas observé d'action de l'acide ascorbique.

IV. *Acides aminés.* — Après des observations préliminaires de BAKWIN et BODANSKY montrant que la phosphatase de l'intestin peut être inhibée par les produits d'autolyse de la muqueuse de cet organe, BODANSKY [15-17] localisa sur les acides aminés l'activité de ceux-ci. Une analyse plus poussée du phénomène montra que, pour chaque acide aminé, il existe une concentration (0,002 à 0,0006 M en général) à laquelle ces corps sont activateurs. Ils présentent cette propriété jusqu'à une concentration optima (0,0001 M à 0,01 M selon les cas), au delà de laquelle ils sont d'abord moins activateurs, puis inhibiteurs. Ces observations ont été faites sur les phosphatases du rein, de l'intestin, de l'os. Elles ont été depuis confirmées par divers auteurs, en particulier HOVE, ELVEHJEM et HART [41].

En résumé, l'ion Mg^{++} est l'activateur le plus certain, de la phosphomonoestérase A_1 , Mn^{++} étant probablement encore plus actif dans des conditions particulières. Quant à l'activation par les acides aminés elle est plus faible et celle par l'acide ascorbique est incertaine. Pour ceux de ces corps dont l'étude a été poursuivie de façon systématique, on a constaté que l'activation augmente en fonction de la concentration en produit efficace jusqu'à un optimum, au delà duquel elle diminue, le même corps devenant inhibiteur pour des taux encore plus élevés. C'est là un fait qu'il conviendra de retenir pour comprendre le mode d'action des activateurs.

Quant à l'activation de la pyrophosphatase alcaline elle a été très peu étudiée et il y a lieu d'envisager de nombreuses recherches à son sujet.

2. INHIBITEURS.

On connaît beaucoup plus d'inhibiteurs que d'activateurs des phosphatases alcalines, mais quelques-uns de ceux-ci (oxydants) n'exercent sans doute qu'une action indirecte sur l'activité phosphatasique dans les cellules ou les préparations impures et d'autres (métaux) sont des inhibiteurs généraux des enzymes et leur effet n'est pas spécifique.

I. *Ion phosphorique.* — PO_4^- est un inhibiteur général des phosphatases sur lesquelles il agit indépendamment de sa participation à l'équilibre entre les constituants du milieu ré-

actionnel. Il inhibe en effet l'hydrolyse (ERDTMANN [32-33]) et la synthèse (Mac VICAR [61]) des esters et l'hydrolyse des pyrophosphates à concentration très faible (quelques mg. P par cm³). Cet effet défavorable sur l'activité des phosphatases est d'autant plus marqué que le taux des phosphates augmente ; il est indépendant de la concentration en substrat. Son importance physiologique et expérimentale est considérable, car l'apparition d'ions $\text{PO}_4^=$ au cours de l'hydrolyse enzymatique ralentit celle-ci.

II. *Ion arsénique*. — De nombreux auteurs, frappés par le fait que les arsénates favorisent la phosphorylation des glucides par les levures (HARDEN, NEUBERG) ont cherché à mettre en évidence une activation des phosphatases par $\text{AsO}_4^=$. Selon YAMANE [90] celle-ci aurait été observée avec certains substrats et pour MINNITI [66], elle serait la règle avec la phosphatase du foie fœtal humain et du placenta. En réalité ces observations paraissent inexacts et l'effet inhibiteur des arsénates doit aujourd'hui être considéré comme bien établi. On l'a mis en évidence sur la phosphoestérase rénale (ERDTMANN [32-33], MUNEMURA [68]) et intestinale (KLEIN et ROSSI [53]) et sur la pyrophosphatase alcaline (MUNEMURA [68]). Toutefois, il ne se manifesterait pas sur l'enzyme du sérum (BRAUNSTEIN [18]).

III. *Thiols (cystéine, glutathion)*. — WALDSCHMIDT-LEITZ, WEIL et PURR [86] étudiant l'hydrolyse des acides glycérophosphoriques, adénylpyrophosphorique, créatinéphosphorique et thymonucléinique par un extrait de rein, ont observé que cette réaction était ralentie par H_2S et la cystéine, mais non par la cystine à pH = 9,0. LOHMANN [59], reprenant ces expériences, constate qu'à pH = 7,4 le glutathion est indifférent et la cystine faiblement inhibitrice et met en doute l'action des dérivés sulfhydrylés. KÖSTER et BERSIN [54] n'ont pas pu reproduire les résultats de WALDSCHMIDT-LEITZ à pH = 8,6 et ils pensent que le glutathion, l'acide thiolactique, H_2O_2 , l'acide arsénieux, n'ont pas d'action inhibitrice. Par contre SCHÄFFNER et BAUER [80] déclarent que les thiols sont des inhibiteurs généraux des phosphatases A_1 et A_4 . ALBERS [2] a constaté que le glutathion inhibe les phosphatases alcalines, mais non les acides. De même WILLIAMS et WATSON [89], pour lesquels l'action des thiols sur les premières cesse en présence d'acide monoiodacétique, mais non d'autres oxydants. En réa-

lité, comme l'inhibition par le glycocole à forte concentration cesserait également en présence d'acide monoiodacétique l'effet de ce corps doit être plus complexe. Par ailleurs, PYLE, FISHER et CLARK [71] ; MASSART et VANDENDRIESSCHE [64] ; SCHÄFFNER et BAUER [80] ont constaté l'action inhibitrice des thiols sur la phosphomonoestérase. En revanche, pour BARRENSCHEEN et LANG [10], le glutathion est activateur de l'adénylpyrophosphatase.

Pour WALDSCHMIDT-LEITZ, l'action d' H_2S et des thiols ne serait pas spécifique, mais tiendrait à leur effet sur le potentiel d'oxydoréduction du milieu, mais il n'existe pas de donnée précise sur l'influence du rH sur l'activité phosphatasique et des recherches non publiées de NGUYEN-VAN THOAI n'ont permis de constater l'existence ni d'un potentiel optimum, ni d'un potentiel d'arrêt pour celle-ci.

Nous n'avons pas trouvé de documents sur l'action des thiols sur les pyrophosphatases. Les mêmes corps n'auraient pas d'action sur la synthèse enzymatique des esters (WALDSCHMIDT-LEITZ).

IV. *Acides biliaires*. — L'action de ces corps est discutée, mais il y a lieu d'adopter à leur égard l'opinion de BODANSKY [16], de TAKATA [84], pour lesquels ils sont inhibiteurs de la phosphomonoestérase de l'os et du rein, mais non de celle de l'intestin. Pour OKAMURA [69], ils favoriseraient l'action de la nucléotidase, tandis que pour KURATA [55], ils inhibent l'action phosphoestérasique et que pour TAKATA, ils activent la synthèse enzymatique des esters.

V. *Fluorures alcalins*. — Après la mise en évidence par INOUE [42] de l'effet inhibiteur des fluorures sur les phosphatases acides, KAY [47] a étendu cette observation à la phosphomonoestérase alcaline. La sensibilité de celle-ci diffère suivant les cellules ou humeurs qui la renferment. Dans le cerveau (CEDRANGOLO [21]), les hématies (ROCHE et BULLINGER [73]) et à un degré moindre dans l'os (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [12]) l'enzyme est inhibé par les fluorures alcalins, tandis que tel n'est pas le cas dans le rein et le sérum (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [12] ; MUNEMURA [68]). La pyrophosphatase alcaline est insensible aux mêmes corps (MUNEMURA [68]). Dans l'ensemble les phosphatases alcalines sont peu influencées par les fluorures, inhibiteurs énergiques des enzymes acides de même spécificité. KUTSCHER et WÜST [56] ; MASSART et DUFAY [62]).

VI. *Oxalates alcalins*. — Ces sels sont des inhibiteurs plus généraux et plus forts des phosphatases alcalines que les précédents. MUNEMURA [68] a constaté leur action sur la phosphomonoestérase et sur la pyrophosphatase rénales ; BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [11] ont étendu cette observation au cas de l'estérase du sérum et de l'os. Toutefois, pour ces auteurs l'hydrolyse enzymatique des glycérophosphates ne serait pas influencée par les oxalates dans les extraits de foie et de rein à pH = 8,9. La phosphatase alcaline des hématies est inhibée par ces sels (ROCHE et BULLINGER [73]).

VII. *Glucosides*. — LUNDGAARD [60] rapporte les troubles du métabolisme glucidique provoqués par le phlorhidzose (diabète phlorhidzinique) à un défaut de phosphorylation des glucides dû à l'inhibition des phosphatases par le glucoside. COURTOIS et RABATTÉ [27] ont récemment repris ces recherches sur la phosphomonoestérase A₁ du rein et étendu leurs résultats à toute une série de glucosides.

VIII. *Cyanures alcalins*. — Considérés comme sans action par ROBISON, les cyanures alcalins se sont révélés inhibiteurs de la phosphatase A₁ entre les mains de CLOETENS, cette inhibition pouvant être fortement diminuée par Mg⁺⁺. En présence de SO₄Mg 10⁻²M, la fraction de la phosphatase désignée par CLOETENS sous le nom de phosphatase alcaline I n'est pas inhibée par KCN 10⁻²M, tandis que la fraction dite phosphatase alcaline II l'est fortement. MASSART et DUFAIT [62] ont récemment montré que le cyanure de potassium inhibe la phosphatase du rein et celle des levures, probablement en formant un complexe avec le ou les métaux présents dans le coenzyme.

Aucune donnée relative à l'action des cyanures sur la pyrophosphatase n'a été établie à notre connaissance.

IX. *Inhibiteurs divers*. — On a signalé une diminution de l'activité phosphatasique par de très nombreux corps qui ne semblent pas exercer sur elle une influence spécifique. C'est ainsi que divers ions métalliques, tels que Cu⁺⁺, Mg⁺⁺, Au⁺, Al⁺⁺, gêneraient l'hydrolyse des esters phosphoriques. De même les alcools. Mais il s'agit là d'actions tenant au caractère protéique des enzymes et traduisant leur dénaturation.

Certains alcaloïdes, entre autres la quinine, la morphine, la codéine, seraient très faiblement inhibiteurs.

En résumé, les phosphates inhibiteurs absolus des phosphatases

lases alcalines occupent dans la série des corps gênant l'action de ces enzymes une position unique. De nombreux autres corps sont doués d'une activité inhibitrice plus ou moins bien définie, susceptible de variations encore mal expliquées et méritant d'être étudiées de manière systématique.

3. INACTIVATEURS.

Il convient de distinguer des inhibiteurs, dont l'action est en général réversible à un degré plus ou moins élevé, les agents qui détruisent irréversiblement l'activité des phosphatases alcalines. Les effets de ces deux catégories de corps sont identiques, mais leur mode d'action est tout autre, la destruction des enzymes étant en général le fait d'agents non spécifiques.

L'activité des phosphatases dépend du pH et de la température du milieu. L'existence d'un optimum thermique témoigne du fait que les réactions catalysées par ces enzymes sont d'autant plus rapides que la température est plus élevée jusqu'à une limite, déterminée par le début de la dénaturation de l'apoenzyme protéique. Il n'y a donc pas à proprement parler d'activation par la chaleur, tandis qu'une destruction par celle-ci est une inactivation définitive de l'enzyme.

En ce qui concerne le pH, il existe par contre une activation par les ions H^+ et OH^- , ou plus exactement par une proportion d'ions H^+ et OH^- particulière à chaque enzyme. Cette activation est maxima au pH optimum d'action. Mais ces ions peuvent en outre, dans certaines conditions devenir des inactivateurs : une acidité ou une alcalinité dépassant certaines limites de pH détruisent les phosphoestérases et les pyrophosphatases. En règle générale, les phosphatases alcalines sont plus stables en milieu neutre ou faiblement alcalin (ammoniacal) et les enzymes acides en milieu faiblement acide (acétique) ; toutefois une acidité et une alcalinité excessive détruisent tous les enzymes. BAMANN et DIEDERICHS [5] ont pu, se basant sur cette propriété, séparer les enzymes A_1 et A_2 du foie. Il convient de signaler que les phosphatases A_1 des divers organes sont d'une sensibilité différente à cet égard, celle des os étant plus rapidement détruite que celle du foie à pH = 9. C'est seulement au voisinage de la neutralité que ces enzymes sont assez stables ; aussi les expériences destinées à déterminer un pH optimum d'action doivent-elles être

assez brèves, car l'inégalité des activations aux divers pH risquerait d'en fausser les résultats. L'inactivation d'une phosphatase par séjour à un pH déterminé méritait d'être signalée en raison de son intérêt pratique car elle a parfois permis, se basant sur les différences de comportement des phosphatases acides ou alcalines, de séparer celles-ci dans leurs mélanges naturels.

Il convient en outre de signaler ici l'inactivation par dialyse prolongée notée par divers auteurs et particulièrement étudiée à plusieurs reprises par ALBERS et ALBERS [3], puis par ALBERS [2]. Lorsque la phosphatase rénale est soumise à la dialyse pendant trois jours dans des conditions de pH et de température bien réglées, elle s'inactive, mais le mélange du dialysat à la solution mère dialysée fait reparaitre partiellement l'activité phosphoestérasiq^{ue} A₁. ALBERS considère que ces faits traduisent la séparation de l'holoenzyme en apoenzyme colloïdal et coenzyme dialysable. S'il en est ainsi on comprend que l'inactivation par dialyse soit irréversible. Ces expériences, d'un intérêt capital, méritent d'être reprises et étendues.

C. — Mode d'action des activateurs et des inhibiteurs.

Il est actuellement difficile dans la plupart des cas de se représenter le mécanisme de l'effet activateur ou inhibiteur, ignorant la constitution de l'enzyme et la nature de ses groupements se combinant au substrat et aux produits de son doublement. Par ailleurs seuls de rares activateurs ou inhibiteurs ont fait à cet égard l'objet d'une étude systématique.

L'ion $\text{PO}_4^=$ est le seul inhibiteur général des phosphatases alcalines ou acides. Selon JACOBSEN [45], il est inhibiteur absolu aux faibles concentrations en substrat auquel il se combine, probablement par un groupement actif du coenzyme. A concentration plus élevée il devient en outre inhibiteur par concurrence, son activité diminuant au fur et à mesure que le milieu est plus riche en substrat ; ce second mode d'inhibition reposerait sur une combinaison à l'apoenzyme.

Le mode d'action de l'ion Mg^{++} a été plus étudié. Les recherches de BAMANN ont montré qu'en général, la phosphoestérase est d'autant plus sensible à Mg^{++} qu'elle est plus pure, mais nous ne possédons aucun renseignement précis sur le mode de combinaison de l'activateur à l'enzyme. Tout au plus peut-

on inférer du fait que, Mg^{++} activant certaines phosphatases, en inhibant d'autres et étant indifférent vis à vis de certaines, il ne doit pas s'unir à un groupement actif du coenzyme, mais à l'apoenzyme. Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec les recherches de ROCHE et NGUYEN-VAN THOAI [77], démontrant que Mg^{++} augmente l'affinité des phosphatases alcalines et diminue celle des phosphatases acides pour le substrat. Les mêmes auteurs ont en outre établi que Mg^{++} empêche partiellement l'action inhibitrice de $PO_4^{=}$ et d' $AsO_4^{=}$ comme l'avaient pensé ERDTMANN [33] et HOLMBERG [38].

Diverses hypothèses ont en outre été formulées : pour JENNER et KAY [46], Mg^{++} formerait un complexe actif : Enzyme-Magnésium qui, pour HOLMBERG [38], serait moins sensible que l'enzyme libre à l'action défavorable de $PO_4^{=}$. Cette opinion repose sur le fait que Mg^{++} n'activerait la phosphatase (intestin) qu'au delà d'un certain pourcentage d'hydrolyse du substrat ; argumentation sans doute fragile puisque la vitesse de la réaction d'hydrolyse augmenterait dès le début de celle-ci pour BODANSKY [15] (os, rein, intestin).

Selon BAUER, étudiant particulièrement le cas de la pyrophosphatase de levure (pH optimum = 6,4) le substrat S se combinerait au magnésium en donnant un composé $^+SMg^-$, lequel s'unit à l'enzyme E, pour donner $^+EMgS^-$, facilement dissociable et donnant naissance, par l'intermédiaire d' $^+Mg-E-S^-$ à E-S, lequel ne peut se former directement et dont la naissance est la première étape de l'action enzymatique. De toute manière la formation d'une combinaison de l'enzyme à l'activateur est admise universellement, mais le rôle de cette combinaison dans l'hydrolyse enzymatique du substrat demeure inconnu. Pour ERDTMANN [33], CATTANEO, GABRIELLI et SCOZ [19], cette combinaison n'interviendrait qu'en protégeant l'enzyme contre son inhibition spontanée. Pour CLOETENS [25], la combinaison E-S ne serait que très peu active et elle le deviendrait en s'unissant à Mg pour donner Mg-E-S.

Signalons enfin que, pour HOMMERBERG [39], les sels de magnésium pourraient, à eux seuls, hydrolyser les esters phosphoriques. Récemment BAMANN, reprenant des expériences qu'il a poursuivies antérieurement avec SALZER [9], adopte à nouveau cette opinion et considère que la constitution de l'apoenzyme et la disposition des groupements actifs dans l'holoenzyme régleraient le comportement de celui-ci vis à vis de Mg^{++} , comportement variable selon l'origine de la phosphatase, ainsi que nous l'avons signalé.

L'activation par les acides aminés à faible concentration serait, pour BODANSKY [15], due à la protection de l'enzyme contre l'inactivation spontanée. Cette explication, cadrant mal avec l'effet inhibiteur de ces corps à concentration relativement élevée, ne peut plus guère être acceptée après les travaux d'HÖVE, ELVEHJEM et HART [41] démontrant le couplage des actions de Zn^{++} et de l'alanine. Tout se passe comme si les acides aminés constituaient avec des ions métalliques un activateur spécifique dont on ne peut pas encore expliquer comment il intervient dans la catalyse enzymatique. Ces faits sont certainement en relation avec d'autres signalés par CLOETENS [22] sur le remplacement des métaux les uns par les autres en tant qu'activateurs et sur le caractère indispensable de la présence de plusieurs métaux pour l'activité phosphatase.

Pour CLOETENS [22], la phosphatase alcaline dite du type II, contient deux groupements : g_1 et g_2 , combinés à des métaux : M_1 et M_2 . La dialyse contre de l'eau distillée permettrait de séparer la combinaison g_1M_1 tandis que seule la dialyse contre KCN 10^{-2} M séparerait de l'enzyme g_2M_2 à $pH = 9,0$. Zn serait le métal contenu dans g_2M_2 de la phosphatase du sérum (Chien, Pore), M pouvant être indifféremment Ca , Mg , Mn , Co ou Ni . Lorsque M_1 est constitué par Ca , Mg ou Co , M_2 peut être Co ou Hg , l'activation des apophosphatases par ces métaux tenant à leur fixation par les groupements actifs. Les expériences de MASSART et DUFAY sur l'inactivation des phosphatases par les cyanures, sans permettre des conclusions aussi précises, apportent des arguments en faveur de cette manière de voir.

En ce qui concerne les oxalates et les fluorures alcalins, diverses opinions ont été émises. Selon COURTOIS [26] les oxalates agiraient en précipitant Mg^{++} et, selon INOUE [43] les fluorures seraient au contraire des inactivateurs irréversibles. Toutefois d'autres auteurs envisagent la combinaison de l'enzyme aux oxalates et aux fluorures. BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [13] estiment qu'il y aurait formation simultanée dans le milieu réactionnel de deux combinaisons : Enzyme-Substrat et Enzyme-Oxalate. Si l'on ajoute dès le début $PO_4^{=}$, la formation du second est empêchée et les oxalates sont inactifs. MASSART et DUFAY [63] ; CRUSE et ROSE [28] considèrent les fluorures comme formant un composé avec le coenzyme.

Pour ces auteurs, et pour KUTSCHER et WÜST [56] l'action des fluorures alcalins tiendrait au blocage d'un métal présent dans le coenzyme ; il en serait de même de l'action inhibitrice des cyanures.

Il n'est pas certain que le mécanisme de l'action des fluorures sur la phosphatase alcaline soit identique à celui qui préside à l'effet des mêmes corps sur la phosphatase A_2 à optimum acide. Dans ce dernier cas, selon KUTSCHER et WÜST [56], F^- se combinerait à l'enzyme sur le même groupe que le substrat et en le déplaçant, l'affinité relative du substrat pour l'enzyme déterminant la grandeur de l'action de F^- . Cette interprétation ne peut pas être tenue pour générale puisque, comme l'a montré COURTOIS [26], dans le cas de la phosphatase A_2 de la moutarde, F^- augmente l'affinité de l'enzyme pour le substrat, tandis que dans le cas de la phosphatase A_3 de la takadiastase, il est inhibiteur concurrent du substrat et diminue l'affinité de l'enzyme pour celui-ci.

Enfin l'action du potentiel d'oxydoréduction du milieu sur l'activité phosphatasique a été considérée comme expliquant les effets de certains corps (WALDSCHMIDT-LEITZ). Comme nous l'avons vu cette interprétation ne doit sans doute pas être retenue. En ce qui concerne l'inhibition par les thiols, au sujet de laquelle elle a surtout été mise en avant, elle ne saurait rendre compte des faits observés, puisque la cystine exerce, comme la cystéine, un effet inhibiteur pour ALBERS [2], point qui nous paraît d'ailleurs être vérifié. Toutefois, pour KIESE et HASTINGS [50] la phosphatase alcaline serait inhibée jusqu'au dixième de son activité initiale par hydrogénation en présence de platine ou de palladium et réactivée par passage d'un courant d'oxygène dans le milieu. Cette expérience, pourtant capitale, n'a fait l'objet que d'une brève note et n'a jamais été reproduite.

En résumé, l'activation et l'inhibition ne relèvent certainement pas d'un mécanisme unique et simple, mais dans la plupart des cas, il est certain qu'elles sont dues à la combinaison de l'enzyme au corps modifiant son activité. Seuls les corps agissant avec régularité peuvent être considérés hypothétiquement comme unis au coenzyme et encore faut-il qu'il s'agisse alors de corps ayant une action spécifique réelle. Parmi ceux-ci tous ceux pouvant donner des complexes avec des métaux tiennent probablement leur activité inhibitrice de leur union avec un métal contenu dans le coenzyme. De même l'activation par certains métaux relève sans doute de leur fixation par le coenzyme dont ils deviennent un constituant.

Par contre, il apparaît comme certain que de nombreuses substances d'activité faible et irrégulière ne peuvent inter-

venir qu'en se combinant à la partie protéique, à l'apoenzyme, dont l'affinité pour eux et pour le substrat est susceptible de varier sous les influences les plus diverses.

D. — Action des activateurs et des inhibiteurs sur les phosphatases alcalines de divers organes.

La sensibilité des phosphatases alcalines aux divers activateurs et inhibiteurs est variable selon l'organe ou l'humeur d'où elles ont été extraites, comme nous l'avons déjà signalé. Les différences observées sont si grandes que l'on a pu envisager soit l'existence de phosphatases particulières à divers organes (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI), soit l'existence dans ceux-ci d'un mélange de deux phosphatases en proportions diverses (CLOETENS). Enfin la solubilité des enzymes (lyoenzymes solubles et desmoenzymes insolubles) va de pair avec leur sensibilité à Mg^{++} .

En ce qui concerne cet ion l'enzyme du rein peut être très fortement activé (JENNER et KAY [46] ; BAMANN et DIEDERICH [5]), jusqu'à près de 9.000 p. 100 dans certains cas. Celui de l'os ne le serait pas pour HOMMERBERG [39], tandis qu'il pourrait l'être pour ROSSI [78], pour DAVIES [29]. En réalité, dans le cas de ce dernier, des différences considérables se manifestent selon le degré de développement des organes, comme l'a montré une étude systématique poursuivie par ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [75]. Chez les animaux jeunes, l'enzyme existe dans les os à un degré d'activation pratiquement maximum, tandis qu'il n'en est pas ainsi chez les animaux adultes où le système phosphatasique est « au repos ». Aussi Mg^{++} ne provoque-t-il qu'une augmentation minime de la vitesse de l'hydrolyse par l'enzyme d'os d'animaux jeunes, tandis qu'il renforce considérablement celle opérée par les os des adultes. L'enzyme intestinal est peu sensible à Mg^{++} avant qu'un certain pourcentage d'hydrolyse du substrat n'ait été atteint (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [13], HOLMBERG [38]).

La seule différenciation de plusieurs phosphatases A_1 basée sur la diversité de leurs réactions à Mg^{++} a été tentée par CLOETENS [25], lequel distingue deux phosphatases alcalines (I et II) de la manière suivante : « La phosphatase I est inactive en l'absence de Mg^{++} et, en présence de $Mg\ SO_4\ 10^{-2}\ M$ n'est pas influencée par $KCN\ 10^{-2}\ M$. La phosphatase II, active en l'absence de Mg^{++} est variablement influencée par $Mg\ SO_4$

10^{-2} M, qui est complètement inhibée par KCN 10^{-2} M. Le rapport de la phosphatase I à la phosphatase II croît, chez les animaux envisagés, dans l'ordre : intestin < os < poumon < rein < foie ». Bien que la phosphatase I ait pu être isolée, si tant est que les caractères choisis permettent d'individualiser une phosphatase, on ne saurait souscrire sans réserve au point de vue de CLOETENS, car l'activation par Mg^{++} paraît susceptible de varier en intensité sous l'influence de nombreux facteurs, tels que l'âge des préparations, la durée d'extraction de l'enzyme (GIRI [37]). Aucune recherche de cet ordre n'a été faite sur la pyrophosphatase.

Le fait que la phosphoestérase de l'intestin est insensible aux acides biliaires, inhibiteurs du même enzyme extrait du rein, de l'os, du sérum, est pour BODANSKY [16] la traduction de la diversité de ces deux types de phosphomonoestérase. La pyrophosphatase des divers organes n'a pas été étudiée de ce point de vue.

L'acide ascorbique serait activateur de la phosphoestérase du sérum (TANNHAÜSER et collaborateurs [85]) et inhibiteur de celle de l'intestin (EULER et SVENSON [34]), du rein (ALBERS) ; mais il semble que la purification des enzymes les rende inactivables par la vitamine C (ALBERS). Pour BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [13], il convient de diviser les phosphatases alcalines en deux catégories, dont les types respectifs seraient l'enzyme du foie et du rein d'une part, celui de l'os et sans doute du sérum d'autre part, en se basant sur les arguments suivants : alors que l'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na est beaucoup plus rapide en présence de tampon au glyocolle que de tampon au véronal pour l'enzyme osseux, on observe le contraire avec l'enzyme du foie et du rein. L'inhibition de celles-ci par les oxalates alcalins est empêchée par addition de phosphates au cours de l'hydrolyse du substrat, tandis que celle de l'enzyme osseux tend rapidement à devenir permanente. Les premières sont beaucoup moins labiles que la dernière en milieu acide. Enfin la phosphatase hépatique n'est pas inhibée par les oxalates et les fluorures, tandis que celles de l'os, du cerveau et du sérum le sont nettement par les oxalates et très faiblement par les fluorures alcalins (BELFANTI et collaborateurs ; CEDRANGOLO [21]).

Il est certain que des faits de cet ordre pourraient être mis en évidence avec d'autres modifications de l'activité enzymatique et que l'on pourrait répéter sur les pyrophosphatases —

non étudiées jusqu'ici à cet égard — des observations analogues à celles que l'on vient de résumer. Mais la signification profonde de celles-ci nous paraît encore imprécise et l'on pourra seulement la dégager d'expériences poursuivies sur les enzymes purifiés extraits des divers organes.

En résumé l'action des activateurs et des inhibiteurs sur les phosphatases alcalines de divers organes ne paraît pas identique en intensité ; parfois même certains corps sont activateurs ou inhibiteurs des enzymes dans un organe et indifférents vis à vis des mêmes phosphatases dans un autre organe. Ce fait peut tenir : soit à l'existence dans les uns et les autres : d'activateurs ou d'inhibiteurs naturels particuliers à chacun rendant inefficaces les corps actifs sur les phosphatases d'autres organes, soit à des différences dans la partie protéique (apoenzyme) des phosphatases des divers tissus.

E. — Activation et inhibition de la synthèse des esters par les phosphatases alcalines.

La synthèse d'esters phosphoriques et de dérivés pyrophosphoriques dans les cellules présente un intérêt capital ; il est facile de la provoquer ou de l'inhiber dans des tissus *in vitro*. Sa réalisation à l'aide d'enzymes, agissant sur des substrats bien définis a permis un ensemble de travaux, mais on n'a pu encore reproduire ainsi que des estérifications d'alcools très simples, en sorte que certains auteurs admettent l'existence d'un enzyme de synthèse, la phosphatase (von EULER) distinct des phosphatases et intervenant seul dans les processus de phosphorylation du métabolisme cellulaire.

Nous nous bornerons ici à résumer les principaux travaux sur la synthèse enzymatique des esters phosphoriques *in vitro*, en milieu de composition définie. KAY [48] a publié une étude montrant que la phosphomonoestérase alcaline (intestin) peut opérer *in vitro* la synthèse des monoesters de l'acide orthophosphorique. Les α - et β -glycérophosphates et l'ester phosphorique du glycol ordinaire ont été isolés à l'état pur ainsi que le méthylphosphate de potassium après synthèse par la phosphomonoestérase A_1 du rein ou de l'intestin. Dans le cas du glycérophosphate on obtient un mélange avec prédominance de l'isomère α , alors que l'enzyme hydrolyse préférentiellement le β (KAY [47]).

L'enzyme catalyse aussi bien l'hydrolyse que la synthèse

et la quantité de catalyseur n'a aucun effet sur la position de l'équilibre. Par contre, la concentration en enzyme retentit sur la vitesse initiale qui croît avec elle selon une relation presque linéaire. D'autres facteurs influent sur la cinétique de la synthèse. Ce sont : le pH, la concentration en phosphate et en alcool, comme la loi de GULDBERG et WAAGE permettait de le prévoir. MAC VICAR [61] opérant la synthèse enzymatique du méthylphosphate signale que la vitesse croît avec la concentration initiale en phosphates, mais toutefois jusqu'à un certain point, au delà duquel l'ion $\text{PO}_4^{=}$ manifeste son pouvoir inhibiteur. CH_2OH à trop forte dose, provoque une inhibition due à la dénaturation de la partie protéique de l'enzyme. COURTOIS [26] a comparé l'activité hydrolysante et synthétisante d'un autolysat de rein sur des doses constantes de réactifs : eau, glycérol, phosphore total.

ACTIVATEURS ET INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE.

Le problème de l'action activatrice de Mg^{++} sur la synthèse n'est pas résolu de façon satisfaisante. Des travaux de KAY indiquent que Mg^{++} n'a aucune action activatrice. D'après MORII, les arsénates n'ont aucun effet sur les réactions de synthèse des esters glycérophosphoriques. L'acide cholique active la synthèse du glycérophosphate, par la phosphomonoestérase du rein (TAKATA [84]).

WALDSCHMIDT-LEITZ et ses collaborateurs [86] [87] [88] ont émis l'hypothèse que les systèmes intracellulaires catalysés par les phosphatases sont influencés de façon directe vers l'hydrolyse ou la synthèse suivant le potentiel d'oxydo-réduction gouverné par l'équilibre entre $-\text{SH}$ et $\text{S}=\text{S}$. Ces mêmes auteurs maintiennent que le glutathion réduit, la cystéine et SH_2 contrarient l'hydrolyse des monoesters, mais ont peu d'effet sur la synthèse. Cette hypothèse a été récemment reprise par COURTOIS [26]. KAY [47] a montré que le fluorure de sodium empêchait l'action synthétisante de l'enzyme du rein.

Dans l'ensemble les travaux sur la synthèse enzymatique des esters phosphoriques *in vitro* dans des systèmes bien définis sont peu nombreux et aucun d'eux n'est consacré à l'action des phosphatases d'optimum d'action acide. Il n'existe pas à notre connaissance, de travail sur la synthèse des pyrophosphates par une phosphatase.

F. — Objet du travail.

Les travaux antérieurs sur l'activation et l'inhibition des phosphatases laissent sans solution un grand nombre de problèmes. Nous ignorons dans bien des cas si tel corps modifiant l'action de la phosphomonoestérase alcaline exerce la même influence sur la pyrophosphatase et aucune différenciation systématique de ces deux enzymes par leurs activateurs et inhibiteurs respectifs n'a été entreprise.

De plus, le même enzyme extrait de différents organes ne présente pas toujours la même sensibilité vis à vis des mêmes activateurs et inhibiteurs et, en outre, l'on ne sait pas si des différences du même ordre séparent les pyrophosphatases de certains organes. Ces faits ne peuvent pas être rapportés avec certitude à l'existence de diverses phosphatases particulières à chaque organe. Au demeurant, il est indispensable pour se faire une opinion sur ce point de reprendre les travaux antérieurs sur des préparations purifiées. De même la question de l'existence de deux phosphoestérases alcalines demeure ouverte.

Enfin l'activation et l'inhibition de la synthèse des esters phosphoriques n'a fait l'objet que d'un nombre très restreint de travaux et il y a lieu d'étendre ceux-ci à de nombreux corps dont l'influence est mal connue ou inconnue.

L'objet de notre travail est d'étudier l'action activatrice ou inhibitrice de divers corps sur la phosphomonoestérase et la pyrophosphatase alcalines de divers organes ou cellules (foie, intestin, globules blancs, os, rein) en nous attachant particulièrement aux problèmes suivants :

1. — *Définir l'action activatrice ou inhibitrice d'une série de composés déjà examinés par d'autres auteurs avec des résultats incertains.*

2. — *Etudier l'action d'oxydants et de réducteurs sur les deux enzymes, afin de mettre en évidence un effet systématique éventuel des uns et des autres et, s'il y a lieu un potentiel d'oxydoréduction optimum ou un potentiel d'arrêt, comme pour les protéinases.*

3. — *Comparer l'action des inhibiteurs et des activateurs sur les extraits d'organes bruts et sur les enzymes purifiés, afin de rechercher si la purification des phosphatases n'atténue*

pas ou ne fait pas disparaître les différences de caractères tenant à leur provenance, signalées par divers auteurs.

4. — *Comparer l'action de corps susceptibles de produire des effets inhibiteurs ou activateurs sur la phosphomonoestérase et sur la pyrophosphatase, afin d'individualiser ces enzymes par d'autres caractères que leur spécificité.*

5. — *Comparer l'action de divers activateurs et inhibiteurs sur l'hydrolyse et sur la synthèse des glycérophosphates par la phosphomonoestérase alcaline, afin de mieux définir le mécanisme de la synthèse et de rechercher si les deux réactions inverses sont ou non catalysées par un même enzyme, l'existence d'une phosphatase synthétisante différente de la phosphatase étant admise par de nombreux auteurs.*

L'étude de ces diverses questions a exigé la mise au point de techniques particulières à l'étude de certaines d'entre elles, entre autres la préparation d'enzymes purifiés. Nous en examinerons le détail dans la seconde partie de ce travail.

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles sur l'activation et l'inhibition des phosphatases alcalines.

PLAN GÉNÉRAL DES RECHERCHES.

L'étude des questions que nous nous proposons d'aborder a tout d'abord posé des problèmes techniques généraux de préparation et de purification des phosphatases alcalines, puis des problèmes particuliers à des expériences à poursuivre sur chaque type d'activateur ou d'inhibiteur. Nous examinerons dans un *premier chapitre* les résultats acquis au cours de nos essais de purification des enzymes et décrirons à ce propos la préparation de ceux-ci à partir de divers organes. Un *second chapitre* sera consacré à l'étude d'activateurs et d'inhibiteurs sur l'hydrolyse des esters et des pyrophosphates par les enzymes bruts ou purifiés au moyen de diverses méthodes. Enfin, un *troisième chapitre* comprendra les résultats acquis sur les modifications de la synthèse enzymatique des esters sous l'action des activateurs et des inhibiteurs de sa vitesse. De brèves discussions terminent chaque chapitre et des conclusions générales coordonnent celles-ci.

CHAPITRE I.

PRÉPARATION ET PURIFICATION DE LA PHOSPHOMONOESTÉRASÉ ET DE LA PYROPHOSPHATASE ALCALINES.

L'extraction aqueuse des organes permet d'obtenir les enzymes solubles ou lyoenzymes, tandis que les desmoenzymes demeurent fixés aux constituants insolubles des tissus. Cette séparation grossière de deux fractions enzymatiques présente un intérêt particulier dans le cas des phosphatases puisque, comme l'a montré BAMANN, leur sensibilité aux activateurs n'est pas identique.

Il n'est pas possible de purifier un desmoenzyme, en raison même de son insolubilité et, lorsque nous avons étudié un catalyseur de ce groupe, nous nous sommes bornés à le séparer du lyoenzyme correspondant par extraction aussi complète que possible de celui-ci, la phosphomonoestérase et la pyrophosphatase demeurant dans la même préparation.

En revanche, il a été possible de purifier les phosphatases solubles et nous avons poursuivi des essais en vue de séparer l'estérase de la pyrophosphatase. La plupart des techniques employées jusqu'ici dans ce but consistent en : 1) l'extraction par un solvant où les enzymes sont solubles tandis que les constituants protéiques des tissus qui les accompagnent dans les macérations aqueuses ne le sont pas ; 2) l'inhibition spécifique d'un enzyme dans des conditions respectant l'intégrité de l'autre ; 3) l'adsorption suivie de l'élution spécifique.

La première de ces méthodes a permis de préparer la phosphoestérase A_1 du rein, purifiée par autolyse de l'organe en milieu hydro-alcoolique additionné d'éther acétique, (ALBERS et ALBERS [3]) et de séparer une estérase active sur les glycérophosphates mais non sur le phénylphosphate de sodium

(ROCHE et LATREILLE [76]). De même la séparation de la phosphomonoestérase de la diestérase alcaline peut être réalisée par adsorption et élution à des pH déterminés (ROCHE et LATREILLE [76]). La seconde a été employée par BAMANN et DIEDERICH [5] pour séparer les phosphatases acides des phosphatases alcalines du foie, par ROCHE et BULLINGER [73] pour séparer l'enzyme A_1 de l'enzyme A_4 des globules rouges. La troisième est surtout préconisée par les biochimistes japonais de l'école d'AKAMATSU dont l'expérience nous a montré que les résultats étaient parfois impossibles à reproduire.

Les travaux antérieurs aux nôtres sur l'adsorption des phosphatases sont principalement dûs à KURATA, ASAKAWA et TAKAHASHI, ce dernier s'étant attaché à l'étude des enzymes alcalins. Selon TAKAHASHI [82], on sépare la pyrophosphatase alcaline d'un autolysat de rein (Lapin) par adsorption sur kaolin en présence de PO_4KH_2 $M/10$, puis après addition de PO_4Na_2H $M/10$ au milieu, de la phosphoestérase ; la solution ayant subi ce double traitement ne renfermerait plus que de la pyrophosphatase.

Mis en présence d'hydrate ferrique et de PO_4Na_2H $M/10$ l'extrait perd sa pyrophosphatase par adsorption, la solution ne contenant plus alors que la phosphoestérase. Enfin quand l'autolysat de rein est traité par le kaolin en présence d'un mélange équimoléculaire de PO_4KH_2 et de PO_4Na_2H , le kaolin étant ensuite traité par PO_4Na_2H $M/10$, on obtiendrait un éluat ne renfermant que de la phosphomonoestérase. De très nombreux essais faits dans des conditions analogues ne nous ont en aucun cas permis de reproduire ces résultats.

Nous avons poursuivi trois catégories d'expériences dans le but de purifier les phosphatases alcalines et de les séparer ; à savoir : des essais d'adsorption et d'élution spécifiques, des essais de précipitation fractionnée par l'alcool ou l'acétone et des essais d'inactivation sélective par chauffage à différentes températures et à divers pH.

A. — Matériel d'étude et dosage de l'activité phosphatasique.

1. — EXTRAITS ENZYMATIQUES BRUTS.

Nos expériences ont porté sur des préparations enzymatiques provenant d'intestin, de rein, de foie de Chien, d'os d'embryons de Chèvre et de Mouton ; et des globules blancs du sang de Cheval, obtenues de la manière suivante :

L'intestin une fois prélevé est débarrassé de son contenu et nettoyé par passage d'un fort courant d'eau, puis ouvert sur toute sa longueur. La muqueuse, détachée en raclant légèrement au scalpel, est mise à macérer dans environ deux fois son volume d'eau chloroformée, puis abandonnée à la glacière (+ 2°) pendant un temps variant de une à plusieurs semaines, l'activité ne diminuant pas sensiblement avec le temps. Au moment de l'usage, la macération est centrifugée et c'est le liquide surnageant que nous allons utiliser comme lyo-enzyme. Dans le cas du foie, nous avons opéré uniquement sur la pulpe des cellules hépatiques, celle-ci ayant une activité phosphatasique supérieure à celle de la trame conjonctive [58]. La pulpe recueillie par passage du foie à la presse à main est traitée comme la muqueuse intestinale, mais son séjour à la glacière n'excède généralement pas une durée de huit jours, car les enzymes s'y inactivent plus rapidement.

La préparation de macération rénale est obtenue de la manière suivante. Le rein est coupé en menus morceaux puis passé au broyeur Latapie. La pulpe rénale est alors abandonnée à l'autolyse pendant une semaine dans deux fois son volume d'eau chloroformée.

Les os, après avoir été broyés le plus finement possible au mortier, sont mis à macérer dans une fois leur volume d'eau chloroformée et abandonnés, huit à dix jours à la température du laboratoire (ROBISON).

Enfin les globules blancs ont été préparés par le procédé que voici : Le sang de Cheval défibriné est passé à travers une gaze et centrifugé ; les globules blancs recueillis à l'aide d'une pipette à large ouverture sont mis en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1000 et centrifugés. On les lave deux fois avec la même solution et c'est leur suspension dans celle-ci qui est utilisée.

2. — SUBSTRATS.

Les α - et β -glycérophosphates de sodium purs ont été préparés par M. O. Bailly, que nous remercions d'avoir mis ces produits à notre disposition.

Des échantillons de pyrophosphate de sodium pur des maisons Prolabo et Kahlbaum ont été employés pour nos essais.

Enfin l'adénylpyrophosphate de sodium a été préparé à partir du sel de baryum du même corps, que nous remercions M. le Professeur O. MEYERHOF (Philadelphie) de nous avoir obligeamment confié.

3. — DOSAGE DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE.

D'une manière générale nous avons mis en présence : 1 cm³ de mélange tampon de MICHAËLIS [65] pour des pH compris entre 8,4 et 6,3, de mélange tampon de KING et DELORY [52] pour des pH supérieurs à 8,3.

1,5 cm³ de solution d'ester phosphorique ou de pyrophosphate de sodium correspondant à 4,65 mg. P.

0,5 cm³ de solution enzymatique.

et la quantité de HCl N/10 ou de NaOH N/10 nécessaire pour obtenir le pH voulu. Le volume total est porté à 5 cm³ avec de l'eau distillée.

Le temps d'hydrolyse choisi est généralement court : 30 minutes pour les enzymes de l'intestin, une heure à une heure trente pour le rein, le foie, les os, afin qu'elle ne porte que sur une fraction assez faible du substrat, mais soit toujours suffisante pour permettre le dosage de PO₄⁻ sur une faible prise d'essai (0,1 à 1 cm³ du filtrat de déprotéinisation (1). Les expériences ont été poursuivies à 37°. L'hydrolyse est arrêtée par addition de 2 cm³ d'une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100 ; les protéines sont éliminées par filtration. Le dosage du phosphore se fait selon la micro-méthode de BRIGGS-ROBISON ; la coloration bleue ainsi obtenue étant dosée à l'aide d'un colorimètre à cellule photoélectrique (Helcomètre) ou du photomètre de PULFRICH, les courbes d'étalonnage établies à l'aide de solutions titrées étant fréquemment vérifiées.

B. — Purification des enzymes et essais de fractionnement.

Phosphatases intestinales.

ADSORPTION ET ÉLUTION (A).

a. — Les premiers essais de purification des enzymes ont consisté en l'adsorption de phosphatases intestinales sur *kaolin* et leur élution à divers pH.

Nous avons opéré de la manière suivante :

Dans une série de sept tubes nous avons mis en contact 0,250 g. de kaolin (préalablement traité par l'acide chlorhy-

(1) De toute manière, la quantité absolue de substrat hydrolysé est toujours dosable avec précision. Nous avons exprimé nos résultats en pour cent de substrat dédoublé afin de permettre de les comparer directement, ce qui nous a parfois amené à indiquer des valeurs très faibles. Mais étant donné la manière dont celles-ci ont été déterminées, il y a lieu de les considérer comme aussi significatives que les valeurs plus élevées.

drique fumant pendant 15 à 30 jours et lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité) et 5 cm³ de macération intestinale. Les différents tubes ont été portés aux pH de 4,00 - 4,95 - 6,24 - 6,78 - 7,50 - 8,28 - 9,06, mesurés au pHmètre à électrode de verre.

Après une agitation mécanique de 30 minutes à 20° nous avons séparé par centrifugation d'une part les liquides surnageants, d'autre part les culots de kaolin ayant adsorbé les enzymes.

Chacun des liquides surnageants a été ramené à pH = 7,0 de même chacun des culots mis en suspension dans 5 cm³ d'eau distillée. Nous avons étudié parallèlement l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium à pH = 9 et celle du pyrophosphate de sodium à pH = 8 (pH optima d'hydrolyse de ces deux substrats comme nous l'avons établi précédemment) en présence de 0,5 cm³ de liquide surnageant ou de suspension de kaolin. Le protocole expérimental suivi est celui décrit antérieurement.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU I. — *Activité phosphatasique relative au pH optimum d'action (p. 100 de substrat hydrolysé) du liquide surnageant et de l'adsorbat sur kaolin d'une macération intestinale vis-à-vis de β -glycérophosphate de Na et de pyrophosphate de Na.*

pH d'adsorption	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
I. — Liquide surnageant.		
4,00	3,98	2,36
4,95	0,62	2,2
6,24	35,2	18,9
6,78	71,0	22,8
7,50	70,0	24,3
8,28	69,4	25,8
II. — Adsorbat.		
4,00	37,3	10,5
4,95	32,2	14,0
6,24	18,75	5,05
6,78	9,45	3,85
7,50	6,9	2,9
8,28	6,9	4,3
Témoin non traité	98,0	38,8

Une autre expérience faite entre 2,5 et 5 a confirmé cette donnée.

En voici le résultat :

TABLEAU II. — *Activité phosphatasique relative* (p. 100 substrat hydrolysé) *des enzymes intestinaux adsorbés au kaolin à divers pH vis-à-vis du β -glycérophosphate de Na et du pyrophosphate de Na.*

pH d'adsorption	β -glycérophosphate	pyrophosphate
2,4	0,2	3,6
3,5	5,7	2,5
4,2	45,1	31,1
5,3	29,5	19,5
Témoin non traité	90,7	62,4

On peut conclure de l'examen de ces données que l'adsorption se fait au mieux à un pH de 4,20 environ, les enzymes s'inactivant spontanément par ailleurs aux pH alcalins ou en milieu trop fortement acide.

Après avoir déterminé quel était le pH auquel l'adsorption se faisait avec le meilleur rendement, nous avons élué à différents pH le culot de kaolin ayant adsorbé les phosphatases intestinales à pH = 4,9. Nous avons établi que le pH optimum d'éluion est de 9. Ces données sont du même ordre que celles déterminées par ROCHE et BULLINGER [73] lors de la purification de la phosphatase A₁ des hématies. Elles cadrent assez bien avec celles établies par TAKAHASHI [83] en ce qui concerne les zones de pH d'adsorption et d'éluion au kaolin, mais elles sont en désaccord absolu avec elles au sujet de la spécificité de la séparation des deux phosphatases. En effet, contrairement à l'auteur japonais, nous n'avons jamais obtenu une phosphomonoestérase dépourvue d'action pyrophosphatasique.

En pratique nous avons conservé l'adsorption au kaolin et l'éluion des enzymes pour les séparer de leurs impuretés naturelles, en réalisant la première opération dans un milieu contenant un tampon acétoacétique (M/30-M/50) de pH = 4,6 et la seconde en présence d'ammoniaque à 1 p. 100. Ces opérations répétées plusieurs fois permettent d'obtenir des préparations très actives et ne contenant plus que des quantités très minimes de protéines (moins de 0,1 mg. par cm³).

b. *Cholestérol et autres agents d'adsorption.* — Le manque de spécificité du kaolin en tant qu'adsorbant nous a conduit

à essayer après traitement de la macération par le kaolin et élution ammoniacale l'adsorption des enzymes sur du cholestérol déjà employée par EHRENSWAARD [30], de l'acide stéarique ou du pyrophosphate d'argent. Les deux premiers corps ajoutés à l'éluat à l'état de solution alcoolique précipitent en adsorbant les enzymes. Nous avons opéré deux précipitations successives par l'acide stéarique ou le cholestérol et reprise du précipité dans l'ammoniaque à 1 p. 100. Cette solution hydrolyse le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium. Nous avons pu constater que l'activité relative des enzymes sur le pyrophosphate diminuait beaucoup plus rapidement que celle sur l'ester avec le nombre de précipitations. Toutefois les purifications successives comportent des pertes importantes de l'activité enzymatique et nous n'avons pas réussi à éliminer complètement la pyrophosphatase en conservant un pouvoir phosphoestérasique important.

Enfin nous avons essayé de faire une adsorption sur le *pyrophosphate d'argent*. Après adsorption sur kaolin et élution ammoniacale, 25 cm³ de macération intestinale sont additionnés de 15 cm³ de pyrophosphate de sodium à pH = 7,1 et de 1,5 cm³ de solution de NO₃Ag à 10 p. 100 ; le précipité formé recueilli par centrifugation est mis en suspension dans l'eau ; l'argent est éliminé sous forme de sulfure d'argent au moyen de SH₂, l'excès de SH₂ étant chassé par un courant d'air que l'on fait barboter dans la solution.

Cet essai a été tout à fait infructueux car les quantités de phosphore libérées après hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium sont si infimes qu'il nous a été impossible de les doser.

PRÉCIPITATION PAR L'ALCOOL OU L'ACÉTONE (B).

Nous avons essayé de purifier les phosphatases intestinales par précipitation par l'alcool à 95°, ou par l'acétone (1). Pour cela nous avons additionné 10 cm³ de macération intestinale de 4 cm³ d'alcool ou d'acétone ; le précipité formé est recueilli par centrifugation et mis en suspension dans 5 cm³ d'eau distillée ; nous avons ainsi une première solution enzymatique. Le liquide surnageant le culot de centrifugation est recueilli et additionné de 1 cm³ d'alcool ou d'acétone puis traité comme

(1) L'acétone employée dans ces expériences a été laissée en contact avec du permanganate de potassium pendant 18 heures puis distillée.

précédemment. Les liqueurs alcooliques ou acétoniques sont successivement enrichies en alcool ou acétone de manière à obtenir des mélanges renfermant 40 cm³, 50 cm³, 75 cm³, 100 cm³ d'alcool ou d'acétone et 100 cm³ de solution enzymatique initiale. Le précipité obtenu après chaque traitement est mis en suspension dans 5 cm³ d'eau distillée où il ne se redissout que partiellement, et l'on étudie l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium à pH = 9 et celle du pyrophosphate de sodium à pH = 8 par ces solutions enzymatiques.

On trouvera dans le tableau III un exemple des résultats obtenus.

TABLEAU III. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 de substrat hydrolysé) des solutions aqueuses des précipités obtenus par addition d'alcool ou d'acétone à 10 cm³ de macération intestinale.*

Précipitation par l'alcool			Précipitation par l'acétone		
cm ³ d'alcool	β -glycéro- phosphate	Pyro- phosphate	cm ³ d'acétone	β -glycéro- phosphate	Pyro- phosphate
0	60,5	33,6	0	60,5	33,6
4,0	12,9	2,74	4,0	15,3	2,91
5,0	24,3	7,5	5,0	9,2	1,87
7,5	27,6	9,9	7,5	35,2	16,1
10,0	14,9	2,86	10,0	2,9	1,35

Il résulte de ces essais que :

1° dans le cas de l'alcool, ce qui précipite après addition de 40 cm³ p. 100 est presque inactif et peut être éliminé, tandis qu'à 75 p. 100 on récolte la plus grande partie de l'enzyme.

2° pour l'acétone, c'est à 50 p. 100 que l'on a l'élimination des protéines inactives tandis qu'à 75 p. 100 l'enzyme est récolté avec un rendement de 50 p. 100 environ.

Ceci se vérifie aussi bien pour l'hydrolyse du β -glycérophosphate que pour celle du pyrophosphate de sodium.

Nous avons mis à profit ces résultats dans les expériences qui ont suivi, sur l'action des activateurs et des inhibiteurs, en *couplant l'adsorption, l'élution et la précipitation acétonique*. Les solutions enzymatiques employées dans ces cas avaient été préparées la plupart du temps par adsorption sur kaolin à pH = 4,8 et élution à pH = 9. L'éluat ainsi obtenu est alors additionné de quantités croissantes d'acétone, afin d'étudier la concentration pour laquelle la précipitation de

l'enzyme est maxima. Comme les éluats sont beaucoup moins riches en protéines que les macérations, la précipitation de l'enzyme par l'acétone n'a lieu qu'à une concentration beaucoup plus élevée en celle-ci, comme le montre l'essai ci-dessous :

Pourcentage d'acétone	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
	—	—
45 p. 100	1,36	1,62
50 p. 100	4,90	3,45
60 p. 100	21,00	5,55
66 p. 100	9,6	3,60

C'est donc à 60 p. 100 d'acétone (60 cm³ d'acétone pour un volume total de 100 cm³) que la précipitation de l'enzyme est maxima. Cette purification est certainement la plus efficace de celles que nous avons employées parce qu'elle combine l'adsorption spécifique et l'élimination d'impuretés non protéiques par précipitation acétonique de l'enzyme.

ESSAIS DE SÉPARATION DE LA PYROPHOSPHATASE ET DE L'ESTÉ- RASE INTESTINALES PAR CHAUFFAGE A DES TEMPÉRATURES ET A DES pH DIFFÉRENTS (C).

Nous avons pensé qu'à certains pH et à certaines températures les deux phosphatases pourraient avoir une stabilité différente et avons essayé de les séparer par ce moyen. Dans une première série d'expériences nous avons successivement porté une quantité de macération intestinale ajustée à un pH de 4,0 à des températures variant de 37° à 60° pendant dix minutes avant de la faire agir sur les substrats.

Le même essai a été répété à pH = 5,3 - 6,3 - 7,9 - 9,2. Aucune inhibition spécifique n'a été notée, les deux enzymes étant détruits à 58° à pH = 4 et 9, à 66° aux pH voisins de la neutralité (1). Toutefois la pyrophosphatase paraît légèrement plus sensible que l'estérase. Une autre expérience a été faite en chauffant à 50° pendant 20 minutes la macération ajustée à des pH variant de 2,1 à 10,9.

Là encore comme le montre le tableau suivant nous n'avons pu effectuer aucune séparation, mais nous avons pu constater que dans l'extrait brut la stabilité de l'enzyme était identique de pH = 4 à pH = 9, une inactivation brutale se produisant au delà de ces pH.

(1) Ces données cadrent avec celles antérieurement établies par UMEMO, par LUERS, pour lesquels la phosphoestérase rénale est inactivée à 60-65° et la pyrophosphatase de malt vers 57°.

TABLEAU IV. — *Activité phosphatasique relative* (p. 100 de substrat hydrolysé) *des macérations intestinales chauffées à diverses températures à pH = 9,2 ou à 50° à divers pH pendant 20 minutes.*

Température	β -glycéro-phosphate	Pyro-phosphate	pH	β -glycéro-phosphate	Pyro-phosphate
37°	50,5	17,8	2,1	1,7	2,63
46°	32,3	11,3	3,00	1,7	2,86
48°	30,7	10,2	4,04	49,0	20,2
50°	28,4	8,1	4,95	60,5	18,6
52°	21,0	8,6	6,24	62,0	21,6
54°	22,6	7,1	6,78	56,5	21,6
56°	20,2	6,4	7,5	56,5	23,2
58°	4,0	2,4	8,28	60,5	22,3
Témoin	55,5	20,2	9,00	53,0	22,2
			9,88	5,6	3,6
			10,98	1,2	3,04
			Témoin non chauffé	64,5	32,2

Phosphatases osseuses.

Nous avons reproduit sur des préparations d'os d'embryon de Mouton les mêmes expériences d'adsorption sur kaolin et d'éluat ammoniacale que celles faites avec des préparations d'enzymes intestinaux.

Dans le cas des os il faut aussi se placer à un pH légèrement inférieur à 5 pour adsorber au mieux et éluer à pH = 9 pour obtenir le meilleur rendement.

Phosphatases rénales.

Les phosphatases rénales s'adsorbent sur kaolin et s'éluent dans les mêmes conditions que celles de l'intestin et des os.

Nous avons en outre essayé de préparer la pyrophosphatase suivant la méthode de TAKAHASHI. Pour cela 40 cm³ de macération de rein de Cheval sont additionnés de 8 cm³ de PO₄KH₂ et mis en contact avec 8 g. de kaolin pendant une heure à 37°. Après centrifugation le culot est mis en suspension dans 20 cm³ de PO₄Na₂H M/10 et additionné de 2 g. de kaolin puis porté à l'étuve à 37° pendant 2 heures. Après une dernière centrifugation l'éluat est mis à dialyser contre de l'eau distillée pendant 3 jours.

D'après KURATA une macération rénale maintenue au bain-

marie bouillant pendant 5 minutes aurait conservé un activateur spécifique de la pyrophosphatase. Nous avons traité une macération rénale selon KURATA et opéré dans une série de tubes l'hydrolyse du pyrophosphate ou du β -glycérophosphate de sodium par la solution enzymatique préparée selon TAKAHASHI, additionnée ou non d'activateur de KURATA ».

Voici les pourcentages d'hydrolyse obtenus :

Substrats	sans activateur	avec activateur	Macération non traitée
Pyrophosphate de Na.	1,18	1,16	3,54
β -glycérophosphate de Na.	1,16	1,80	6,80

Comme on le voit il n'est pas possible de reproduire la séparation des phosphatases rénales selon le mode opératoire décrit par TAKAHASHI à partir du rein de Cheval ni d'obtenir « l'activateur de KURATA » en utilisant celui-ci.

Phosphatases hépatiques.

Des expériences d'adsorption sur kaolin et d'élution ammoniacale nous ont montré que les phosphatases alcalines du foie s'adsorbent et s'éluent dans les mêmes conditions que celles de l'intestin. Il en est de même pour leur précipitation acétonique ou alcoolique.

Nous avons réalisé la *préparation de l'adénylpyrophosphatase du foie* selon JACOBSEN afin d'étudier certaines de ses propriétés.

40 cm³ de macération de foie sont additionnés de 13 cm³ de ClNH₄ à 10 p. 100, puis chauffés pendant 6 minutes au bain-marie à 55° après avoir été ajustés à pH = 6,1. Le précipité formé est recueilli par centrifugation et lavé deux fois avec une solution de ClNH₄ à 1 p. 100 et enfin repris par de l'eau distillée et dialysé pendant 1 heure. Nous avons ensuite fait agir cette préparation sur l'adényltriophosphate, le pyrophosphate, et le β -glycérophosphate de Na à concentration M/20 et à pH = 7,8. Le pourcentage de substrat hydrolysé a été :

Adényltriophosphate	45,0
Pyrophosphate	2,4
Glycérophosphate (β)	4,7

Tels sont les résultats que nous avons obtenu dans nos essais de purification et de séparation des phosphatases alcalines de divers organes.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I.

Il ne nous a pas été possible de séparer la pyrophosphatase de la phosphomonoestérase alcaline de l'intestin, des reins, du foie, des os, les préparations décrites par TAKAHASHI n'étant pas reproductibles. L'étude de l'adsorption et de l'élution de ces enzymes, de leur inactivation par la chaleur à divers pH, de leur précipitation par l'alcool et l'acétone neutres, a néanmoins permis de définir certains de leurs caractères et de les purifier.

Les deux enzymes présentent une stabilité à peu près constante entre pH = 4 et 9, mais sont très rapidement détruits aux pH > 9 et < 4. Ils sont précipités par l'alcool et l'acétone à concentration de 45 p. 100 environ, d'abondantes impuretés protéiques étant insolubles à des taux inférieurs en ces solvants. Ils sont adsorbés au kaolin au pH optimum de 4,5 et élués au pH optimum de 9,0. L'adsorption au cholestérol permet en outre de séparer de l'éluat obtenu après traitement au kaolin une phosphomonoestérase alcaline pauvre en pyrophosphatase.

Il n'existe à ces divers égards aucune différence entre les enzymes des divers organes étudiés. En pratique, nous nous sommes arrêtés pour la purification de ces enzymes à l'adsorption sur kaolin à pH = 4,5, suivie de l'élution à pH = 9. L'éluat est ensuite précipité par addition d'acétone pure au taux de 50 cm³ p. 100 cm³ et le précipité, pauvre en enzyme, éliminé. L'éluat est ensuite enrichi en acétone jusqu'à un taux de 50 p. 100 en celle-ci. Le précipité obtenu renfermant la presque totalité des enzymes est repris par l'eau qui en redissout la plus grande partie : on dispose alors d'une solution enzymatique purifiée ne renfermant que des quantités minimes de protéines.

CHAPITRE II.

LES ACTIVATEURS ET LES INHIBITEURS DE LA PHOSPHOESTÉRASE ET DE LA PYROPHOSPHATASE ALCALINES DES DIVERS ORGANES ANIMAUX.

La revue d'ensemble des travaux antérieurs sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines, faisant l'objet de la première partie de notre travail, a montré l'existence de lacunes et de contradictions dans nos connaissances à ce sujet. Nous avons entrepris un ensemble de recherches pour contribuer à combler les premières et à éclaircir les secondes.

Pour cela nous avons :

d'une part repris l'étude de l'action de corps dont les effets sur les enzymes de certains organes sont bien établis, comme les sels de magnésium, et examiné les effets de la purification des enzymes sur leur action en présence d'activateurs et d'inhibiteurs divers, et

d'autre part, examiné systématiquement l'influence d'oxydants et de réducteurs sur l'activité phosphoestérasique et pyrophosphatasique, avant et après purification des enzymes.

Nous présenterons d'abord la totalité des résultats expérimentaux avant de discuter les diverses conclusions qu'il est possible d'en tirer. Ce mode d'exposition, à certains égards désavantageux, nous a été imposé par le fait qu'il n'est possible d'examiner l'action de certains facteurs sur l'activité enzymatique, qu'en la comparant à celle d'autres.

Le plan de ce chapitre est le suivant :

- A. — Action de l'ion Mg^{++} .
- B. — Action des thiols et des disulfures.
- C. — Action de l'acide ascorbique.
- D. — Action d'oxydants et de réducteurs divers.
- E. — Action des acides aminés et du zinc.
- F. — Action de l'acide cholique.
- G. — Action des oxalates et des fluorures.

A. — Action de l'ion magnésium (1).

Enzymes de l'intestin.

LYOENZYME : *Macération brute et enzymes purifiés.* — Nous avons étudié l'action des sels de magnésium sur les enzymes de différents organes bruts ou purifiés, sur le β -glycérophosphate et sur le pyrophosphate de sodium. Dans le cas de l'intestin nous avons recherché si l'action de Mg^{++} était la même sur le desmoenzyme et sur le lyoenzyme.

Le mélange hydrolysant comprenait :

1,5 cm³ de solution de dérivé phosphorique correspondant à 0,93 mg. de phosphore par cm³ de mélange hydrolysant dans le cas de l'ester, à 1,86 mg. dans le cas du pyrophosphate de Na, et à 0,200 mg. dans le cas de l'adényltri-phosphate de Na,

1 cm³ de solution tampon des divers pH et 0,5 cm³ de solution enzymatique.

Nous ajoutons au mélange 0,1 cm³ d'une solution de sulfate de magnésium de concentration telle qu'elle nous permette de réaliser une échelle de qMg et portons au volume total de 5 cm³.

Le phosphore libéré au cours de l'hydrolyse est dosé selon la méthode de BRIGGS-ROBISON, comme il a été indiqué précédemment.

Nous avons reporté dans le tableau V les valeurs obtenues pour l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les lyoenzymes bruts et par les mêmes enzymes purifiés par adsorption au kaolin à pH = 4,6 et élution ammoniacale.

Nous observons, aussi bien dans le cas de l'enzyme brut que dans celui de l'enzyme purifié, une hydrolyse maxima pour qMg = 2,5 ou qMg = 3 et ceci pour les deux substrats. Avec l'enzyme purifié, une forte concentration en magnésium (qMg = 1) inhibe l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium. A qMg = 3 nous observons une activation de 30,0 p. 100 pour l'hydrolyse du pyrophosphate et de 31,0 p. 100 pour le β -glycérophosphate de sodium et, avec l'enzyme brut, une activation de 14,6 p. 100 pour le β -glycérophosphate et de 19 p. 100 pour

(1) Nous avons adopté pour exprimer la concentration en magnésium des milieux étudiés, la notation logarithmique proposée par JENNER et KAY, à savoir qMg = $-\log [Mg]$; [Mg] désignant la molarité en sel de magnésium.

le pyrophosphate de sodium. La purification rend donc les enzymes plus sensibles à l'activation.

TABLEAU V. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) sur du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de Na, des lyoenzymes intestinaux bruts et purifiés en présence de Mg^{++} à diverses concentrations.*

Lyoenzymes bruts			Lyoenzymes purifiés	
qMg.	β -Glycéro- phosphate	Pyro- phosphate	β -Glycéro- phosphate	Pyro- phosphate
1	53,0	40,7	9,4	0,67
2	53,0	40,5	9,4	2,4
2,5	55,0	44,0	9,7	2,22
3	52,0	43,5	9,4	2,22
3,5	49,0	40,7	9,2	2,22
4	43,7	40,0	8,3	1,72
4,5	49,4	34,6	7,4	1,93
5	48,0	40,0	7,4	1,90
5,5	48,0	36,8	7,4	2,0
∞	48,0	36,8	7,4	1,93

DESMOENZYME. — Le desmoenzyme étant un enzyme intimement lié aux cellules nous avons utilisé comme source d'enzyme dans cette expérience, non pas la macération aqueuse de muqueuse intestinale, mais la muqueuse elle-même mise en suspension dans l'eau distillée après son extraction par l'eau pendant 8 jours à 0°.

En hydrolysant le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium par les desmophosphatases nous avons constaté une activation de 5 p. 100 à qMg = 3 pour le pyrophosphate et une activation de 5,4 p. 100 pour le β -glycérophosphate de sodium. Après un séjour d'une heure à 37° la macération est plus activable. L'activation atteint alors 20 p. 100 pour le pyrophosphate et 44,5 p. 100 pour le β -glycérophosphate de sodium.

Voici les pourcentages de substrat hydrolysé.

	Enzyme chauffé	Enzyme non chauffé	[Mg]
β - Glycérophosphate..... }	12,9 10,5	14,8 14,0	qMg = 3 qMg = ∞
Pyrophosphate..... }	32,0 25,8	22,6 21,3	qMg = 3 qMg = ∞

Comme l'avait noté BAMANN, les desmoenzymes sont donc moins sensibles à l'activation de Mg^{++} , mais ils le deviennent après une brève autolyse des cellules auxquelles ils sont liés. La phosphoestérase et la pyrophosphatase se comportent identiquement à ces divers égards.

Enzymes du foie.

Nous examinerons successivement l'action de celles-ci sur l'adénylpyrophosphate, sur le β -glycérophosphate et sur le pyrophosphate de sodium.

Nous avons employé, pour les essais sur le premier, l'adénylpyrophosphatase préparée selon JACOBSEN. La quantité d'adényltriphosphate de sodium soumise à une hydrolyse de 40 minutes à 37° correspond à 400 γ de phosphore par 2 cm^3 ; les opérations ont été faites à $pH = 7,8$ (pH optimum de l'enzyme) et en présence des quantités de sulfate de magnésium suivantes : $qMg = 1 - 2 - 2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 - 5,5$ et ∞ .

L'action de SO_4Mg , aux concentrations de $qMg = 1 - 2 - 3 - 4 - 5$ et ∞ a été étudiée également sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les phosphatases du foie de chien, purifiées par adsorption sur kaolin et élution ammoniacale, les expériences étant conduites suivant notre protocole général.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU VI. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des adénylpyrophosphatase, phosphomonoestérase et pyrophosphatase hépatiques à leur pH optimum d'action, en présence de Mg^{++} à diverses concentrations.*

qMg .	Adénylpyrophosphate	β - Glycérophosphate	Pyrophosphate
1	8,0	10,0	11,3
2	7,25	11,1	14,3
2,5	8,5		
3	7,65	10,8	12,5
3,5	7,65		
4	8,6	10,2	12,5
4,5	9,0		
5	5,6	8,2	12,5
5,5	6,3		
∞	6,1	6,3	8,0

En ce qui concerne l'adénylpyrophosphatase spécifique, on note, contrairement aux observations de JACOBSEN, de BARRENSCHEEN et LANG, une activation à partir de $qMg = 4,5$ avec optimum à $qMg = 4,5 - 4$. L'action activatrice sur la pyrophosphatase est nette à $qMg = 5$ et maxima pour $qMg = 2$. En ce qui concerne la phosphomonoestérase il en est sensiblement de même. Les activations maxima observées sont de 40 p. 100 pour l'adénylpyrophosphatase, de 73 p. 100 pour la pyrophosphatase et de 71 p. 100 pour la phosphoestérase purifiées.

Enzymes du rein.

Nous avons étudié l'action du magnésium sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium, et sur celle du pyrophosphate de sodium, d'une part avec l'enzyme dialysé, d'autre part avec l'enzyme purifié par adsorption sur kaolin et élution.

Voici les résultats obtenus en p. 100 de substrat hydrolysé.

TABLEAU VII. — *Activité phosphatasique relative* (p. 100 de substrat hydrolysé), *sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de Na, des enzymes rénaux bruts et purifiés.*

Macération dialysée			Enzymes purifiés	
qMg.	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
1	16,9	2,2	32,0	29,0
2	32,1	68,0	42,0	46,0
3	32,9	38,2	42,0	46,8
4	28,0	36,8	36,2	43,0
5	25,2	36,8	33,6	40,0
∞	25,2	36,8	30,8	35,5

L'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium subit une activation de 32 p. 100 à $qMg = 3$ et celle du pyrophosphate une activation de 79,5 p. 100 à $qMg = 2$ avec les enzymes bruts dialysés. Avec une forte concentration en SO_4Mg ($qMg = 1$) le taux d'hydrolyse est plus faible et cette inhibition atteint 94 p. 100 pour le pyrophosphate. Dans le cas des enzymes purifiés nous observons avec le β -glycérophosphate de sodium une activation de 40 p. 100 à $qMg = 2$ et $qMg = 3$ et de 31 p. 100 avec le pyrophosphate. En somme, l'activation par Mg^{++} , assez nette pour les deux enzymes, n'est pas modifiée par leur purification.

Enzyme de l'os.

L'action de Mg^{++} n'a pu être étudiée que sur le β -glycérophosphate de sodium ; dans nos préparations le pyrophosphate de sodium n'étant hydrolysé qu'à un taux extrêmement faible, les dosages n'ont pas été possibles. Voici les résultats obtenus.

TABLEAU VIII. — *Activité phosphatasique (p. 100 substrat hydrolysé) de la phosphoestérase des os, dialysée ou purifiée, vis-à-vis du β -glycérophosphate de sodium en présence de Mg^{++} .*

qMg.	Dialyse	Elution
1	21,0	15,3
2	30,0	14,8
3	29,0	25,6
4	28,0	20,6
5	23,8	13,4
∞	23,8	9,8

L'activation est de 26,2 p. 100 avec la phosphatase brute et de 161 p. 100 pour l'enzyme purifié.

Enzymes des globules blancs.

L'activité phosphatasique des globules blancs étant plus faible que celle des organes précédemment envisagés, la quantité de phosphore introduite dans nos essais est plus faible et l'hydrolyse a été poursuivie généralement pendant 24 heures sur l' α - et le β -glycérophosphate de sodium.

En voici les résultats :

TABLEAU IX. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des globules blancs vis-à-vis de l' α et du β -glycérophosphate de sodium en présence de Mg^{++} à diverses concentrations.*

qMg	α - Glycérophosphate	β - Glycérophosphate
1	25,5	55,0
2	39,1	55,0
2,5	22,8	51,0
3	19,6	23,6
3,5	14,0	16,3
4	10,0	15,0
5	10,0	15,0
5,5	4,0	19,0
∞	3,28	18,0

L'effet activateur du magnésium est de 107 p. 100 pour l' α -glycérophosphate et de 206 p. 100 pour le β -glycérophosphate de sodium.

En résumé, l'ion magnésium a toujours une action activatrice aux concentrations voisines de $qMg = 3$ et une action inhibitrice à plus forte concentration ($qMg = 1$). Ce phénomène présente une intensité plus ou moins grande, selon les organes étudiés, mais nous l'avons retrouvé avec les phosphomonoestérases et les pyrophosphatases de tous les organes. Néanmoins nous n'avons jamais observé les taux d'activation très élevés, signalés dans la littérature. Il est possible que ce fait tienne au temps relativement long de macération des organes étudiés. Dans la plupart des cas la purification des phosphatases les rend plus sensibles à l'action du magnésium.

B. — Action des thiols ($R-SH$) et de leurs produits d'oxydation ($R-S-S-R$).

I. — PHOSPHOMONOESTÉRASES.

Diverses séries d'expériences ont été faites en présence de ces corps selon le mode opératoire général adopté. Après avoir mis en évidence l'action de la cystéine, nous avons envisagé de la rattacher à l'oxydation du groupement thiol. Pour cela nous avons, d'une part, étudié comparativement l'action de la cystine et de la cystéine et d'autre part, fait agir avec cette dernière soit un ion favorisant sa déhydrogénation : l'ion Cu^{++} , soit l'acide monoiodacétique qui l'oxyde.

Phosphomonoestérase intestinale.

Cystéine. — Les expériences sont identiques à celles faites avec le magnésium. Nous introduisons dans 5 cm³ des quantités de cystéine (chlorhydrate) égales à 1 mg., 5 mg, 10 mg, 25 mg. La solution de chlorhydrate de cystéine a été ramenée à pH = 9 immédiatement avant son emploi. Dans une première expérience avec l'enzyme dialysé, nous n'avons opéré qu'en présence de cystéine ; dans une deuxième expérience, nos tubes contenaient en outre du sulfate de magnésium à la concentration de $qMg = 3$. Dans une troisième, l'action de la cystéine a été étudiée en présence de cuivre (0,05 mg. SO_4Cu par essai de 5 cm³), en utilisant soit l'enzyme brut, soit l'enzyme purifié par adsorption et élution.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU X. — *Activité phosphatasique relative* (p. 100 substrat hydrolysé) *de la phosphomonoestérase intestinale brute dialysée, ou purifiée par adsorption (kaolin) et élution, vis-à-vis du β -glycérophosphate de sodium en présence de cystéine additionnée ou non de Mg^{++} ($qMg = 3$) et de Cu^{++} (0,05 mg. SO_4Cu dans 5 cm^3).*

Cystéine (mg. dans 5 cm^3)	p. 100 de substrat hydrolysé			
	Sans Mg^{++} enzyme brut	$qMg. = 3$ enzyme brut	$Mg^{++} + Cu^{++}$	
			enzyme brut	enzyme purifié
0 (témoin)	83,5	83,0	39,6	10,4
1	63,0	66,5	33,1	9,0
5	46,0	51,0	22,0	8,2
10	38,0	46,2	10,8	5,4
25	32,0	35,0	8,3	1,2

Dans tous les cas, la cystéine manifeste une *action inhibitrice très marquée*, laquelle n'est ni gênée ni renforcée par l'ion magnésium et qui semble légèrement favorisée par la présence d'ion cuivre (1). Elle paraît diminuer légèrement par purification.

Cystine. — Nous avons répété la même expérience en substituant la cystine à la cystéine, d'une part avec le lyoenzyme brut et d'autre part avec le lyoenzyme purifié par précipitation acétonique.

Voici les pourcentages de substrat hydrolysé.

Cystine (mg. dans 5 cm^3)	Enzyme brut	Enzyme purifié
0	80,5	1,8
1	78,0	2,3
2	78,0	2,5
5	70,5	2,3

Ces résultats montrent que la cystine n'est pas douée d'une action inhibitrice importante. L'oxydation de la cystéine lui fait donc perdre en partie son pouvoir inhibiteur. De même lorsque la cystéine est mise à agir en présence d' H_2O_2 qui l'oxyde, son action est fortement réduite.

(1) Au pH de l'expérience (9,0) l'autoxydation de la cystéine est assez considérable en l'absence de l'addition de SO_4Cu , ce qui explique peut-être la faiblesse des écarts observés dans les témoins et dans les essais contenant du cuivre.

Glutathion. — L'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium en présence de glutathion en proportions variables, de SO_4Mg ($\text{qMg} = 3$) et de SO_4Cu (0,05 mg. dans 5 cm^3) a été étudiée avec le lyoenzyme brut et avec l'enzyme purifié par adsorption (A) ou par précipitation acétonique (B), d'une part, et avec le desmoenzyme, d'autre part.

Voici ce que nous avons obtenu dans les différents cas :

TABLEAU XI. — *Activité phosphatasique relative* (p. 100 substrat hydrolysé) *de la phosphomonoestérase intestinale* (lyoenzyme brut ou purifié et desmoenzyme) *vis à vis du β -glycérophosphate de sodium en présence de glutathion (G-SH).*

Glutathion (mg. dans 5 cm^3)	Lyoenzyme			Desmoenzyme
	Brut dialysé	Purifié A	Purifié B	Brut dialysé
0	39,8	12,8	36,4	11,4
1	37,0	13,0	41,0	8,3
2	34,4	13,0	41,0	7,4
5	27,0	12,0	35,5	6,4
10	15,4	9,3	24,0	4,6

Le glutathion possède donc une *action inhibitrice nette*, voisine de celle de la cystéine à identité du taux de —SH apporté par ces deux corps. Cette action est particulièrement nette avec le desmoenzyme et les produits non purifiés ; par contre elle diminue lors de la purification de l'enzyme.

Phosphomonoestérase hépatique.

Cystéine. — Nous avons étudié l'action de la cystéine sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium à $\text{pH} = 9$ par la phosphatase hépatique provenant soit d'une macération brute dialysée, soit d'une macération purifiée par précipitation acétonique (B). Le système phosphatasique du foie étant moins actif que celui de l'intestin, l'hydrolyse à 37° a été poursuivie pendant une durée de 2 heures.

Les pourcentages d'hydrolyse sont les suivants :

Cystéine (mg. dans 5 cm^3)	Enzyme brut	Enzyme purifié
0	7,25	6,3
1	3,64	3,92
2	—	0,98
5	2,15	0
10	1,74	0
25	2,15	0

L'action inhibitrice de la cystéine sur l'enzyme hépatique est donc très marquée, de fortes doses paraissant être encore plus actives sur la phosphatase hépatique que sur celle de l'intestin.

Glutathion. — L'action du glutathion sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate en présence de 0,01 mg. SO_4Cu par cm^3 et de SO_4Mg à $q\text{Mg} = 3$ a été étudiée avec une macération de foie brute. Le pourcentage d'hydrolyse du substrat est le suivant :

Glutathion (mg. dans 5 cm^3)	p. 100 Substrat hydrolysé
0	27,4
5	13,9
10	9,0

Le glutathion inhibe fortement l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium.

Phosphomonoestérase osseuse.

Nous avons étudié l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium en présence de quantités variables de cystéine et de 0,05 mg. de sulfate de cuivre dans 5 cm^3 , par la phosphatase des os (embryon de chèvre) brute ou purifiée par adsorption (A.). Les pourcentages d'hydrolyse sont les suivants :

Cystéine (mg. dans 5 cm^3)	Enzyme brut	Enzyme purifié
0	23,8	8,0
1	11,5	5,55
2	9,1	5,5
5	4,6	3,86
10	2,1	2,42

Dans le cas des os l'inhibition la plus forte est observée pour la macération brute.

Nous avons étudié comment se comportaient la macération brute et la macération purifiée en présence de cystéine (2 mg.), de SO_4Cu (0,05 mg.) et de SO_4Mg ($q\text{Mg} = 3$).

Voici les résultats obtenus :

Essai	Macération brute	Macération purifiée
Témoin	12,4	4,5
Cystéine	4,6	1,74
Cystéine + Mg^{++} . .	6,0	5,65

Avec la macération purifiée, la cystéine seule inhibe l'hydrolyse, mais en présence de magnésium c'est l'action de celui-ci

qui l'emporte ; non seulement il n'y a plus d'inhibition mais l'on note une activation de 25,6 p. 100. Toutefois cette expérience devrait être reprise systématiquement avec des concentrations variables de cystéine et de magnésium pour que l'on puisse tirer des conclusions fermes.

Phosphomonoestérase rénale.

L'action de la cystéine en présence de 0,05 mg. de SO_4Cu , sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par une macération de rein purifiée par adsorption (A), et celle de la cystéine en présence de SO_4Mg (qMg = 3) sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par une macération de rein brute, ont été étudiées de même en présence de glutathion. Voici les pourcentages d'hydrolyse qui ont été observés.

Cystéine (mg. dans 5 cm ²)	Macération brute qMg = 3	Macération éluée	Glutathion (mg. dans 5 cm ²)	Macération brute qMg = 3
—	—	—	—	—
0	27,4	32,4		
1	20,0	28,0	0	27,4
5	12,8	19,6	5,0	13,9
10	11,9	9,8	10,0	9,0
25	1,0	6,25		

La phosphomonoestérase alcaline de rein est donc inhibée par le glutathion et la cystéine.

En résumé, quelle que soit son origine (os, rein, intestin, foie), la phosphomonoestérase alcaline est fortement inhibée par le glutathion et par la cystéine, mais insensible à l'action de la cystine. Toutefois les différences observées à cet égard selon l'origine de l'enzyme permettent de penser qu'il est accompagné dans les tissus de produits modifiant sa réactivité vis à vis du groupement —SH.

II. — PYROPHOSPHATASES.

Pyrophosphatase intestinale.

Cystéine. — Dans une première série d'expériences nous avons opéré en présence de cystéine, d'une part avec la macération brute, d'autre part avec la macération purifiée par les divers procédés A et B (B comprenant la purification par précipitation acétonique et par précipitation alcoolique) décrits précédemment.

TABLEAU XII. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) de la pyrophosphatase intestinale brute (dialysée) ou purifiée (A, B) en la présence ou en l'absence de Mg^{++} (qMg = 3) et de Cu^{++} (0,05 mg.) en présence de cystéine.*

Cystéine (mg. dans 5 cm ³)	Enzyme brut	Enzyme purifié			Enzyme brut + Mg^{++} + Cu^{++}	Enzyme purifié A + Mg^{++} + Cu^{++}
		A	B (acéto- nique)	B (alcoo- lique)		
0	29,6	5,05	3,0	7,6	15,6	6,8
1	13,8	4,6	1,92	5,85	14,8	5,2
5	6,2	2,94	1,6	5,15	11,1	3,8
10	6,2	1,74	0,90	4,5	6,9	2,13
25	6,0	0,89	—	4,4	—	—

Dans tous les cas la pyrophosphatase intestinale est inhibée par la cystéine, la purification semblant toutefois diminuer sa sensibilité à cet égard.

Cystine. — Nous avons fait un essai avec la macération brute et un avec la macération purifiée par précipitation acétonique. En voici les résultats exprimés en pourcentage d'hydrolyse du substrat.

Cystine (mg. dans 5 cm ³)	Macération brute	Macération purifiée
0	0,53	0,76
1	—	0,67
2	—	0,67
5	—	0,67
10	0,46	0,77
20	0,44	0,73

La cystine n'a qu'une action inhibitrice minime ou pas d'action sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium, aussi bien lorsque celle-ci est effectuée par une macération intestinale brute que par une macération purifiée.

Glutathion. — Nous avons étudié l'action du glutathion (introduit en nature dans nos essais) sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium par les phosphatases intestinales, provenant soit du résidu de macération de la muqueuse (desmoenzyme), soit de la macération elle-même (lyoenzyme). Dans ce dernier cas le lyoenzyme a été purifié par précipitation acétonique (B) les essais ont tous été faits en présence de SO_4Cu et SO_4Mg (qMg = 3).

Voici les résultats obtenus.

TABLEAU XIII. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) de la pyrophosphatase intestinale brute (lyo et desmoenzyme) ou purifiée, en présence de glutathion.*

Glutathion (mg. dans 5 cm ³)	Desmoenzyme brut	Lyoenzyme brut	Lyoenzyme purifié
0	3,4	15,5	9,1
1	2,31	15,5	9,1
2	2,52	15,0	9,1
5	3,95	15,0	8,9
10	4,45	12,9	7,9

Le glutathion ne paraît pas être nettement inhibiteur vis à vis du lyoenzyme intestinal, sauf peut-être à concentration très élevée. Quant au desmoenzyme son comportement plus complexe est difficile à interpréter.

Pyrophosphatase hépatique.

Ici encore nous avons étudié l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium en présence de cystéine avec une préparation de phosphatase hépatique brute dialysée, puis avec une macération purifiée selon la méthode (A) ou (B) et avec une macération préalablement portée 10 minutes à 50°.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XIV. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) de la pyrophosphatase hépatique brute et purifiée (A, B) et chauffée en présence de cystéine.*

Cystéine (mg. dans 5 cm ³)	Enzyme brut	Purification A	Purification B	Macération chauffée
0	3,6	0,25	0,49	2,46
1	3,6	0,19	0,49	—
5	3,34	0,26	0,49	2,22
10	3,34	0,30	0,68	—
25	0,86	0,42	0,68	—

Avec la macération hépatique brute nous observons une faible inhibition à très forte concentration et au contraire une faible activation avec les macérations purifiées (A) et (B). *L'enzyme hépatique paraît très peu sensible à la cystéine.*

Il en est de même avec le glutathion ; voici les résultats d'une expérience faite en présence de $qMg = 3$ et de SO_4Cu (0,01 mg.) : Témoin = 7,9 p. 100 hydrolyse du substrat ; + 2 mg. G - SH = 9,0 p. 100 ; + 5 mg. G - SH = 9,7 p. 100.

Pyrophosphatase rénale.

Nous avons répété sur le rein la même expérience avec la macération purifiée (A) et la macération brute dialysée ; mais dans ce dernier cas les essais ont été faits en présence de 0,01 mg. de SO_4Cu et de SO_4Mg ($qMg = 3$). Nous avons obtenu les pourcentages d'hydrolyse suivants :

Cystéine (mg. dans 5 cm ³ ,	Macération brute	Macération purifiée (A)
—	—	—
0	9,0	4,2
1	8,6	4,5
2	—	4,5
5	5,2	4,75
10	5,2	3,92
25	5,2	—

L'effet de la cystéine est donc faible sur la macération brute, et disparaît pratiquement après purification.

Une expérience identique a été faite en présence de glutathion aux concentrations de 0,2 - 5 mg. ; de cuivre (0,01 mg. de SO_4Cu), de magnésium ($qMg = 3$). L'action inhibitrice de ces corps apparaît constante, les pourcentages d'hydrolyse de substrat étant : Témoin = 9 p. 100 ; + 2 mg. GSH = 6,9 p. 100 ; + 5 mg. GSH = 7,4 p. 100.

En résumé, la sensibilité de la pyrophosphatase aux thiols est moins systématique que celle de la phosphomonoestérase alcaline. Alors que la pyrophosphatase intestinale paraît inhibée par la cystéine, laquelle semble sans action sur certains produits purifiés, le glutathion est presque sans effet sur l'enzyme. Dans le cas des enzymes hépatique et rénal, l'action des corps à groupement —SH est moindre, parfois nulle. De toute manière la pyrophosphatase alcaline est moins fortement inhibée que la phosphoestérase et tout se passe comme si la purification éliminait partiellement un produit nécessaire à l'action des thiols, lesquels ne seraient, si cette opinion est exacte, que des inhibiteurs indirects des pyrophosphatases.

C. — Action de l'acide ascorbique et de l'acide déhydroascorbique.

Nous avons étudié l'action de la vitamine C sur le système phosphatasique de l'intestin, du foie, des os et du rein en faisant agir l'acide ascorbique seul ou en présence de cuivre, lequel favorise son autoxydation en acide déhydroascorbique. Son action combinée avec celle des groupements —SH a fait l'objet de quelques essais portant sur l'hydrolyse de divers substrats par des enzymes bruts ou des enzymes purifiés. Afin de rattacher une action éventuelle de l'acide ascorbique à son oxydation nous avons étudié parallèlement les effets de l'acide déhydroascorbique. L'acide ascorbique était introduit sous forme de solution aqueuse préparée au moment de l'emploi et dont le pH est ramené au pH optimum d'hydrolyse.

Enzymes intestinaux.

Acide ascorbique. — Nous avons tout d'abord étudié l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les lyo et les desmophosphatases intestinales dialysées non purifiées en l'absence et en la présence de cuivre. Les quantités d'acide ascorbique introduites varient de 0 mg. à 50 mg. pour nos essais (volume total 5 cm³) et la quantité de cuivre est de 10 γ Cu⁺⁺ (SO₄Cu). Voici les résultats obtenus.

TABLEAU XV. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des lyoenzymes intestinaux non purifiés sur le β -glycérophosphate, le pyrophosphate et l'adénylpyrophosphate de sodium.*

Acide ascorbique (mg dans 5 cm ³)	Phosphomonoestérase		Pyrophosphatase		Adénylpyro- phosphatase
	sans cuivre	10 γ Cu ⁺⁺	sans cuivre	10 γ Cu ⁺⁺	
0	58,0	58,0	27,9	22,8	51,0
1	60,0	58,0	24,0	11,3	52,5
2	62,0	57,0	20,6	11,6	55,5
5	62,0	56,0	21,6	13,6	50,0
10	66,4	59,0	26,2	17,4	47,0
25	70,0	72,5	32,6	24,0	36,0
50	66,4	75,0	30,2	23,8	13,7

L'activité de la *desmophosphatase* sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et sur celle du pyrophosphate de sodium en

présence d'acide ascorbique, a été étudiée en présence de cuire. Nous n'avons alors observé qu'une activation très minime pour le β -glycérophosphate, plus nette pour le pyrophosphate, comme l'indiquent les pourcentages d'hydrolyse suivants :

Acide ascorbique (mg. dans 5 cm ³)	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	6,7	3,9
5	7,1	4,5
25	6,45	5,15

L'acide ascorbique est faiblement activateur de la phospho-estérase et son action sur les pyrophosphatases est plus complexe. Inhibiteur pur de l'adénylpyrophosphatase, il est inhibiteur de la pyrophosphatase (lyoenzyme) à faible dose, activateur faible à dose très forte. Ce fait, joint à celui de sa faible activité sur le desmoenzyme permet de penser que les observations sont troublées par la présence d'impuretés naturelles des enzymes. Ceci étant, après avoir étudié l'action de l'acide ascorbique sur les enzymes bruts, nous avons voulu voir comment ce corps agissait sur les enzymes purifiés.

Pour cela nous avons purifié l'enzyme soit :

a) par adsorption sur kaolin à pH = 4,9 et élution ammoniacale à pH = 9 ce que nous avons appelé purification A.

b) par précipitation acétonique à 40 p. 100 et reprise aqueuse du précipité obtenu (purification B).

c) par précipitation alcoolique à 40 p. 100 et reprise aqueuse du précipité (purification B') :

d) quelquefois pour un même enzyme nous avons associé les méthodes A et B.

Comme pour l'enzyme brut, les expériences ont porté sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence de SO_4Cu (0,01 mg. pour 5 cm³) et de SO_4Mg (qMg = 3).

Nous avons reporté dans les tableaux XVI et XVII les résultats obtenus pour l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium.

Les purifications subies par les phosphatases intestinales ne modifient pas qualitativement leur comportement vis à vis de l'acide ascorbique. Toutefois elles diminuent la sensibilité de la phosphoestérase à l'égard de ce corps qui n'est plus activateur qu'à très forte dose, la pyrophosphatase étant très faiblement inhibée par de petites quantités de vitamine C.

TABLEAU XVI. — Action de l'acide ascorbique sur l'activité de la phosphoestérase intestinale purifiée vis-à-vis du β -glycérophosphate de sodium (p. 100 de substrat hydrolysé).

Acide ascorbique (mg dans 5 cm ³)	Purification			
	A	B	B'	A + B
0	28,0	25,4	31,8	12,5
1	28,0	22,8	30,4	12,9
2	28,0	22,8	30,4	13,0
5	27,0	23,6	32,1	13,5
10	30,8	25,4	33,8	14,5
25	34,0	25,4	42,5	15,0
50	34,6	25,4	42,5	—

TABLEAU XVII. — Action de l'acide ascorbique sur l'activité de la pyrophosphatase intestinale après diverses purifications (p. 100 substrat hydrolysé).

Acide ascorbique (mg. dans 5 cm ³)	Purification			
	A	B	B'	A + B
0	4,65	1,4	4,25	3,1
1	3,16	1,4	3,4	2,66
2	3,16	1,1	3,12	2,62
5	3,48	1,34	4,0	2,85
10	4,12	1,45	4,65	3,16
25	5,3	2,0	6,0	3,92
50	4,8	3,22	7,05	—

Acide déhydroascorbique. — Après avoir étudié l'action de l'acide ascorbique, nous avons voulu voir si après oxydation la vitamine C avait toujours le même effet. Pour cela nous avons préparé de l'acide déhydroascorbique de la manière suivante :

Nous avons oxydé par passage d'un courant d'air une solution d'acide ascorbique de pH = 6,5 contenant une faible quantité de SO₄Cu servant de catalyseur ; la solution est maintenue à 50° pendant la durée de l'oxydation ; ce temps varie de 1 h. 30 à 2 heures. Au moyen d'une solution de 2-6 dichlorophénolindophénol nous nous sommes assurés que la quantité d'acide ascorbique non oxydé n'était pas suffisante pour nous gêner dans nos expériences.

Nous avons tout d'abord étudié l'action de l'acide déhydroascorbique sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate, du pyrophosphate et de l'adényltriphsphate de sodium par les lyophosphatases intestinales non purifiées.

TABLEAU XVIII. — *Activité relative* (p. 100 substrat hydrolysé) *des lyophosphatases intestinales sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate, du pyrophosphate et de l'adényltriphsphate de sodium en présence d'acide déhydroascorbique.*

Acide déhydro- ascorbique (mg. dans 5 cm ³)	β -Glycérophos- phate	Pyrophosphate	Adényl- triphsphate
0	38,4	16,7	41,3
1	38,4	15,4	38,0
2	37,2	15,4	—
2,5	—	—	41,3
5	38,4	14,8	49,5
10	38,4	14,8	—
25	38,4	17,5	—

La même étude a été faite sur les desmophosphatases intestinales et voici ce qui a été trouvé (p. 100 substrat hydrolysé).

Acide déhydroascorbique (mg. dans 5 cm ³)	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	8,25	1,88
5	5,7	2,15
10	4,4	2,56
15	3,06	2,96

Après avoir envisagé successivement l'action de l'acide déhydroascorbique sur l'hydrolyse de divers substrats par les lyo et desmophosphatases intestinales brutes, l'action de ce corps, lorsque l'enzyme est purifié par adsorption et élution (A) et précipitation acétonique (B), a été étudiée ; nous avons obtenu les résultats suivants (p. 100 substrat hydrolysé) :

Acide déhydroascorbique (mg. dans 5 cm ³)	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	39,8	11,1
1	38,8	11,1
2	39,8	11,1
5	38,8	10,6
10	37,8	10,8
25	36,4	12,3

L'acide déhydroascorbique n'a donc pas d'action sur l'hydrolyse des divers substrats par les lyoenzymes (phosphomono-

estérase et pyrophosphatase). Son effet inhibiteur sur le desmoenzyme paraît tenir à sa dégradation par la préparation. On peut donc *a priori* relier les effets de l'acide ascorbique à son pouvoir réducteur.

Acide ascorbique et thiols. — Après avoir constaté que l'acide ascorbique avait généralement un effet activateur alors que les composés comprenant le groupement —SH avaient au contraire un effet inhibiteur très net, nous avons voulu étudier l'action couplée de la vitamine C et de la cystéine ou du glutathion sur l'hydrolyse de divers substrats par les phosphatases intestinales ou hépatiques. Ces expériences ont toujours été faites en présence de SO_4Mg ($\text{qMg} = 3$) et de cuivre ($20 \gamma \text{SO}_4\text{Cu}$).

Nous avons fait agir la phosphatase intestinale sur le β -glycérophosphate de sodium, soit en la présence de cuivre ($20 \gamma \text{SO}_4\text{Cu}$), soit en l'absence de celui-ci ; nous avons introduit dans chacun de nos essais une quantité fixe de solution aqueuse de chlorhydrate de cystéine (correspondant à 5 mg. de cystéine) et une quantité variable d'acide ascorbique 0, 1, 2, 5, 10, 25 et 50 mg. Voici les résultats obtenus en pourcentage d'hydrolyse du substrat :

Acide ascorbique (mg. dans 5 cm^3)	+ SO_4Cu	Sans cuivre
0	11,5	19,7
1	13,4	26,7
2	13,1	25,5
5	15,3	31,0
10	16,6	33,0
25	16,4	35,4
50	16,8	35,4

Il est net qu'en présence de cuivre la réactivation n'a plus lieu, tandis qu'elle est partielle en l'absence de celui-ci, peut-être parce que dans le premier cas la destruction de l'acide ascorbique est trop rapide, ce qui tend à prouver son action sur l'enzyme et non sur le thiol. Le même résultat a été obtenu sur l'adénylpyrophosphatase.

Enzymes hépatiques.

L'action de l'acide ascorbique en présence de cuivre ($10 \gamma \text{SO}_4\text{Cu}$) et de magnésium ($\text{qMg} = 3$) sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les phos-

phatases hépatiques, se traduit par une activation comme le montrent les pourcentages d'hydrolyse suivants :

Acide ascorbique (mg. dans 5 cm ³)	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	7,25	5,95
1	5,7	6,35
2	6,85	6,6
5	7,25	7,5
10	8,3	9,6
25	8,3	11,5
50	9,6	13,3

Il est à remarquer que l'on n'observe pas ici l'effet inhibiteur initial de la vitamine sur la pyrophosphatase comme dans le cas de l'intestin. Il en est de même sur l'adénylpyrophosphatase purifiée selon JACOBSEN. Nous avons étudié l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence de SO_4Mg ($q\text{Mg} = 3$), de cuivre ($20 \gamma \text{SO}_4\text{Cu}$), de 2 mg. de glutathion et de 0 ou 5 mg. d'acide ascorbique.

Voici les pourcentages d'hydrolyse obtenus :

Acide ascorbique (mg. dans 5 cm ³)	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	6,45	15,8
5	9,3	21,5

L'action de l'acide ascorbique l'emporte sur celle du glutathion et l'on observe un empêchement de l'action du thiol par l'acide ascorbique.

Phosphoestérase osseuse.

Nous avons répété sur les os d'embryon de Mouton les mêmes expériences en opérant uniquement sur le β -glycérophosphate en l'absence de cuivre, soit sans magnésium, soit avec magnésium ($q\text{Mg} = 3$), l'activité pyrophosphatasique de ces organes étant presque indosable.

Voici les pourcentages d'hydrolyse observés :

Acide ascorbique (mg. dans 5 cm ³)	Sans Mg.++	Avec Mg.++
0	7,1	10,5
1	7,5	9,65
2	7,5	9,65
5	7,5	9,65
10	6,9	9,60
25	5,8	8,60
50	4,45	6,30

Alors que pour l'intestin et le foie, et, comme nous allons le voir pour le rein et le sérum sanguin, l'acide ascorbique a un effet activateur sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate, dans le cas de la phosphatase osseuse nous observons au contraire une *inhibition* qui s'accroît encore en présence de magnésium, mais seulement à très forte concentration.

Phosphoestérase rénale.

Les résultats observés exprimés en p. 100 d'hydrolyse du substrat sont groupés ci-dessous.

Acide ascorbique (mg. dans 5 cm ³)	Sans Mg ⁺⁺	Avec Mg ⁺⁺
0	6,8	8,0
1	7,5	8,0
2	8,25	8,0
5	8,25	9,2
10	8,25	11,0
25	9,0	12,5
50	12,5	14,6

On observe ici une activation nette pour des concentrations importantes en acide ascorbique.

Phosphoestérase sérique.

Nous avons utilisé le sérum sanguin de Cheval pour étudier l'action de l'acide ascorbique sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium en absence ou en présence de magnésium (qMg = 3). Nous avons obtenu les résultats suivants exprimés en p. 100 d'hydrolyse du substrat :

Acide ascorbique (mg. dans 5 cm ³)	Sans Mg ⁺⁺	Avec Mg ⁺⁺
0	3,0	3,66
1	3,0	3,11
2	2,8	3,44
5	3,0	3,54
10	3,0	3,54
25	3,21	4,15
50	3,56	5,0

Une faible action activatrice peut, ici encore être observée.

En résumé, sauf pour la phosphatase osseuse, l'acide ascorbique exerce une action favorable sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par la phosphoestérase alcaline des

divers organes, mais seulement à concentration très élevée, et encore cette action est-elle faible. Quant à l'action de l'acide ascorbique sur le pyrophosphate elle est complexe ; elle se traduit par un effet inhibiteur à faible concentration et activateur à très forte. Ce comportement persiste même après purification.

D. — Action d'oxydants et de réducteurs divers.

Après avoir constaté que des corps réducteurs, tels que la cystéine, le glutathion, l'acide ascorbique, inhibaient les phosphatases étudiées, nous nous sommes demandés si l'effet inhibiteur ou activateur de certaines substances n'était pas lié à leur pouvoir oxydant ou réducteur. S'il en était ainsi l'on pourrait espérer qu'il existe un potentiel d'oxydoréduction optimum, comme REISS en a mis en évidence un dans de nombreux systèmes protéolytiques. C'est pourquoi, dans ce qui va suivre, nous avons essayé d'étudier systématiquement l'action de corps oxydants et réducteurs, à savoir :

- l'eau oxygénée
- les perborates
- le ferri cyanure de potassium
- l'iode
- l'acide monoiodacétique
- l'acide sulfhydrique
- les sulfites.

OXYDANTS.

Eau oxygénée. — L'étude de l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les lyophosphatases et desmophosphatases intestinales brutes, en présence de cuivre (SO_4Cu 10 γ) et de SO_4Mg ($q\text{Mg} = 3$), a été poursuivie dans des milieux renfermant de l'eau oxygénée aux concentrations $M/2000$, $M/1000$, $M/500$, $M/200$, $M/100$, $M/50$.

Ces expériences ont été répétées en utilisant une macération intestinale purifiée par adsorption sur kaolin (A) et précipitation acétonique (B), ce que nous désignons dans notre tableau par (A + B).

TABEAU XIX. *Activité phosphatasique (p. 100 substrat hydrolysé) des enzymes intestinaux (lyo et desmoenzymes bruts et purifiés) vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'eau oxygénée.*

H ₂ O ₂	Lyoenzyme brut		Desmoenzyme brut		Lyoenzyme A+B	
	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate	β Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	67,5	40,8	60,0	3,38	28,6	5,1
M/2000	67,5	42,0	75,0	3,08	31,6	5,3
M/1000	68,5	40,5	55,5	3,00	29,8	5,1
M/500	68,0	48,5	57,5	3,08	27,6	5,1
M/200	67,5	45,5	55,5	3,26	33,4	5,1
M/100	69,5	45,0	—	—	—	—
M/50	69,5	—	—	—	—	—

L'eau oxygénée n'a donc qu'un effet activateur irrégulier et très faible. Or nous avons vérifié qu'elle réduit l'effet inhibiteur de la cystéine. Il est donc possible que cette action soit due à l'oxydation d'un inhibiteur naturel.

Perborates alcalins. — L'action des perborates a été étudiée sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les lyophosphatases intestinales, purifiées par adsorption (A) et précipitation acétonique (A + B).

Nous avons introduit des quantités de perborate correspondant à M/2000, M/1000 par rapport au volume total de l'essai, réalisé selon la technique habituelle.

En voici les résultats, exprimés en p. 100 d'hydrolyse du substrat.

Perborate	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	11,8	2,0
M/2000	11,4	2,14
M/1000	10,2	2,14

Le perborate de sodium est donc dépourvu d'action sur les enzymes purifiés.

Ferricyanure de potassium. — Après avoir constaté que les perborates n'avaient aucune action sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium, nous avons essayé d'opérer avec les enzymes purifiés (B) en présence de quantités croissantes de ferricyanure de potassium. Il nous

a été impossible de préciser l'effet produit par des quantités assez importantes de ferricyanure de potassium parce qu'au moment du dosage du phosphore libéré nous obtenions un précipité avec les réactifs employés (solution de molybdate d'ammonium et d'hydroquinone) pour doser le phosphore selon la méthode de BRIGGS.

Voici les résultats trouvés avec de faibles quantités de ferricyanure (exprimés en p. 100 de substrat hydrolysé).

FeCy ₆ K ₃	β-Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	15,8	3,38
M/3000	15,8	1,35
M/2000	15,0	1,80
M/1000	15,5	3,22

L'action du ferricyanure de potassium est donc nulle sur la phosphoestérase ; faiblement inhibitrice sur la pyrophosphatase.

Iode. — L'action de l'iode a été étudiée sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium effectuée soit par les lyophosphatases, soit par les desmophosphatases intestinales en présence de SO₄Mg (qMg = 3) et de cuivre (SO₄Cu = 10 γ).

TABLEAU XX. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des lyoenzymes et desmoenzymes intestinaux vis-à-vis du β-glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'iode.*

Iode	Lyoenzyme		Desmoenzyme	
	β- Glycéro- phosphate	Pyrophosphate	β- Glycéro- phosphate	Pyrophosphate
0	74,5	48,5	6,5	2,4
M/ 3000	—	47,5	—	—
M/ 2000	72,5	45,5	6,4	2,15
M/ 1500	—	45,5	—	—
M/ 1000	69,0	46,0	6,0	2,0
M/ 750	—	46,5	4,5	1,93
M/ 500	62,0	—	4,0	1,73
M/ 400	—	—	2,1	1,24
M/ 300	—	—	2,1	0,9
M/ 100	9,3	42,5	—	—
M/ 50	3,68	—	—	—

L'iode exerce donc à concentration moyenne de M/100 une action inhibitrice celle-ci ne présente aucune spécificité, tous

les enzymes y étant sensibles. Elle est sans doute due à l'oxydation de leur partie protéique.

Acide monoiodacétique. — Nous avons fait agir l'acide monoiodacétique, à des concentrations variant de 0 à $M/100$, sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les lyophosphatases intestinales brutes ou purifiées, en présence de cuivre (10γ SO_4Cu) et de magnésium, ainsi que par les desmophosphatases brutes dialysées.

TABLEAU XXI. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des lyoenzymes bruts et purifiés et des desmoenzymes intestinaux vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'acide monoiodacétique.*

Acide Monoiod-acétique	Lyoenzyme brut 10 γ , SO_4Cu qMg = 3		Lyoenzyme purifié A+B qMg = 3		Desmoenzyme	
	β -Glycéro-phosphate	Pyrophosphate	β -Glycéro-phosphate	Pyrophosphate	β -Glycéro-phosphate	Pyrophosphate
0	14,0	40,0	11,8	2,15	7,7	2,68
$M/2000$	73,0	40,0	10,9	2,15	7,25	2,32
$M/1000$	73,0	42,5	12,0	2,7	7,25	2,48
$M/500$	73,0	37,2	12,0	2,15	7,25	2,23
$M/250$	72,5	41,2	11,8	2,15	7,25	1,82
$M/100$	75,5	41,9	—	—	7,25	2,48

L'acide monoiodacétique semble n'exercer aucune action sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium aussi bien par les lyophosphatases et les desmophosphatases brutes que par les lyophosphatases purifiées.

Le même essai a été fait avec les lyophosphatases brutes en utilisant l'adényltriophosphate de sodium comme substrat et en présence de cuivre ($SO_4Cu = 10 \gamma$) et de qMg = 3.

Voici les résultats exprimés en p. 100 d'hydrolyse.

Acide iodacétique	+ Cu^{++} qMg = 3
0	41,1
$M/1000$	41,1
$M/500$	42,5
$M/100$	46,0

L'acide iodacétique paraît avoir un effet activateur à la concentration de $M/100$.

RÉDUCTEURS.

Cyanure de potassium.

Enzymes intestinaux.

L'action du cyanure de potassium sur l'activité des enzymes dialysés bruts ou purifiés (A + B) a été étudiée lors de l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence de SO_4Mg ($\text{qMg} = 3$) et de cuivre ($10 \gamma \text{SO}_4\text{Cu}$). La solution de cyanure était préalablement amenée au pH optimum d'hydrolyse. Voici les résultats exprimés en p. 100 d'hydrolyse.

TABLEAU XXII. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des lyoenzymes intestinaux brut et purifié vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence de cyanure de potassium.*

CNK	Enzyme brut		L.yoenzyme purifié	
	β - glycéro-phosphate	Pyrophosphate	β - Glycéro-phosphate	Pyrophosphate
0	84,5	38,8	18	6,9
M/ 2000	86	52	18	7,7
M/ 1000	81	48,5	17,6	7,7
M/ 500	75	45,5	13,8	7,45
M/ 250	50,5	35,6	5,95	6,95
M/ 100	25,8	17,4	3,36	5,9

D'après nos premiers résultats le cyanure de potassium exerce un pouvoir inhibiteur important pour une concentration de l'ordre de M/100 ; tandis que pour de faibles concentrations ne dépassant pas M/1000 ce corps possède au contraire une action activatrice sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium cette activation variant de 13 à 30 p. 100.

L'expérience a été reprise en utilisant de très faibles concentrations de KCN. La purification laisse persister les caractères de l'action de KCN à savoir inhibition générale à concentration relativement élevée et légère activation de la pyrophosphatase à faible concentration. Il en est de même en l'absence de cuivre.

Phosphoestérase osseuse.

Nous avons fait agir le cyanure de potassium au cours de l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par la phosphatase osseuse brute et purifiée (A). Un essai a été effectué également avec du cyanure de potassium $M/250$ et du sulfate de magnésium ($qMg = 3$). En voici les résultats exprimés en p. 100 de substrat hydrolysé :

KCN	Macération brute	Macération purifiée
0 témoin)	12,3	46,0
0 ($qMg = 3$)	—	—
$M/250$	6,2	9,8
$M/250 + (qMg = 3)$. .	6,95	75,5

Comme pour l'intestin, le cyanure de potassium inhibe l'hydrolyse du β -glycérophosphate par les phosphatases osseuses, aussi bien brutes que purifiées.

Acide sulfhydrique. — Nous avons introduit dans nos essais 0 cm³, 0,1 cm³, 0,3 cm³, 0,5 cm³ de solution saturée de SH₂, préparée en faisant barboter un courant de SH₂ dans de l'eau distillée. Pour des quantités supérieures à 0,5 cm³, les chiffres trouvés ne sont plus exacts parce que ce composé donne avec l'hydroquinone une coloration bleue qui se superpose à celle du phosphore contenue dans la prise d'essai ; aussi avons-nous borné notre expérimentation aux faibles concentrations en H₂S.

TABLEAU XXIII. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des lyo et desmoenzymes intestinaux vis-à-vis du β -glycérophosphate de sodium en présence de magnésium et de SH₂.*

SH ₂ (mg. dans 5 cm ³)	+ Cu ⁺⁺ + $qMg = 3$ Desmoenzyme	sans Cu ⁺⁺ $qMg = 3$	
		Lyoenzyme	
0	13,2	72,0	70,0
0 cm ³ , 1	—	74,0	69,5
0 cm ³ , 3	5,6	70,5	69,5
0 cm ³ , 5	3,6	70,5	70,5

Pratiquement SH₂ n'a aucun effet important sur les phosphatases intestinales il est toutefois plus inhibiteur de la

phosphoestérase à l'état de desmoenzyme qu'à l'état de lyoenzyme et pourrait activer légèrement la pyrophosphatase à l'état de desmoenzyme. Il s'agit probablement là d'un effet indirect.

Sulfites alcalins — L'action de ces composés a été étudiée sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les lyophosphatases intestinales brutes, en présence de SO_4Mg et SO_4Cu . Voici les résultats exprimés en p. 100 d'hydrolyse.

Sulfite	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
—	—	—
0	68,0	47,0
M/1000	69,5	40,5
M/500	68,0	35,8
M/100	72,0	—
M/50	67,0	38,2

L'action des sulfites est nulle sur la phosphoestérase et inhibitrice sur la pyrophosphatase.

En résumé après avoir passé en revue l'action de ces quelques oxydants et réducteurs, l'on se rend compte qu'ils n'ont pas une action systématique. Toutefois, dans l'ensemble la pyrophosphatase est plus sensible à l'action de certains de ces corps que la phosphoestérase et les desmoenzymes ont leur action modifiée par certains oxydants ou réducteurs qui sont sans action sur les lyoenzymes. Il est probable que les effets observés sont liés à la présence d'impuretés naturelles accompagnant les enzymes plus qu'à des caractères de ceux-ci.

E. — Action de l'acide cholique.

D'après BODANSKY [16] les acides biliaires permettent de différencier les phosphoestérases osseuse et rénale qu'ils inhibent, de la phosphatase intestinale dont ils ne modifient pas l'activité. Aussi nous a-t-il paru intéressant de faire agir l'acide cholique sur les phosphatases (soit brutes, soit purifiées) d'intestin, de foie, de rein de Chien et d'os d'embryon de Chèvre, afin de rechercher si les différences signalées par BODANSKY tiennent à des impuretés naturelles ou sont un caractère de l'enzyme. Par ailleurs l'action de ces corps sur la pyrophosphatase n'a pas été étudiée à notre connaissance.

Enzymes intestinaux.

Les substrats hydrolysés sont le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium. Dans une première expérience les enzymes sont employés à l'état brut et dans l'autre nous les avons préalablement purifiés selon la méthode A (adsorption et élution).

TABLEAU XXIV. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des enzymes intestinaux (brut et purifié) vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'acide cholique.*

Concentration en acide cholique	Enzyme brut		Enzyme purifié	
	β glycéro- phosphate	Pyro- phosphate	β - glycéro- phosphate	Pyro- phosphate
0	39,2	3,36	74,0	26,6
M/2000	39,2	3,36	74,0	25,3
M/1000	32,0	2,63	70,0	25,3
M/500	32,0	3,5	75,0	26,6
M/250	32,0	3,5	77,5	27,3
M/100	32,0	2,82	84,5	28,6

L'acide cholique n'est que faiblement inhibiteur de l'hydrolyse du β -glycérophosphate, aussi bien lorsque l'enzyme est brut que purifié. Il est sans action sur la pyrophosphatase.

Phosphoestérases hépatiques.

Nous n'avons effectué l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium qu'avec l'enzyme brut.

Voici les résultats :

Acide cholique	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	56,0	4,9
M/500	—	6,8
M/250	31,6	4,9
M/125	30,2	4,9
M/50	35,4	4,9

Nos observations confirment celles de BODANSKY. La phosphoestérase hépatique est beaucoup plus sensible que celle de l'intestin à l'action de l'acide cholique. La pyrophosphatase n'est pas affectée par celui-ci.

Phosphoestérase osseuse.

Nous avons utilisé une macération d'os d'embryon de Chèvre, dont une partie a été purifiée selon (A) pour étudier l'hydrolyse du β -glycérophosphate en présence de quantités croissantes d'acide cholique.

Nous avons obtenu les résultats suivants exprimés en p. 100 d'hydrolyse :

Acide cholique	Enzyme brut	Enzyme purifié (A)
0	26,6	17,3
M/2000	25,3	18,0
M/1000	19,6	17,3
M/500	18,1	12,0
M/250	18,1	12,0
M/100	11,0	8,6

Dans le cas de la phosphatase osseuse comme pour la phosphatase hépatique, nous observons une inhibition très nette aussi bien pour l'enzyme brut que pour l'enzyme purifié.

Phosphoestérase rénale.

Nous avons répété avec les phosphatases du rein l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'acide cholique, par l'enzyme brut et par l'enzyme purifié selon (A).

TABLEAU XXV. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des phosphatases rénales brutes et purifiées vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'acide cholique.*

Acide cholique	Enzyme brut		Enzyme purifié	
	β - glycéro-phosphate	Pyro-phosphate	β - glycéro-phosphate	Pyro-phosphate
0	44,0	6,25	6,5	62,0
M/ 2000	41,0	6,00	6,6	59,0
M/ 1000	39,4	5,75	6,5	53,5
M/ 500	35,0	5,6	6,5	50,5
M/ 250	32,0	5,45	6,3	48,0
M/ 100	30,6	5,45	5,95	41,0

L'action de l'acide cholique sur l'enzyme rénal est moindre que sur celui de l'os et du foie, mais plus fort que sur celui

de l'intestin. La pyrophosphatase est beaucoup moins sensible que la phosphoestérase à l'action de l'acide biliaire.

En résumé la sensibilité des phosphatases des divers organes à l'acide cholique n'est pas identique ; mais il semble qu'il s'agit là de différence de degré et non de nature.

F. — Action des acides aminés.

Nous avons successivement envisagé dans cette étude l'action d'un acide aminé, le glyocolle, agissant seul sur les systèmes phosphatasiques bruts ou purifiés de l'intestin, du foie, du rein de Chien, des os d'embryon de Chèvre, puis l'action de l'alanine couplée avec un métal le zinc, sur les phosphatases intestinales du Rat et du Chien.

Enzymes intestinaux.

Nous nous sommes servis soit de la macération brute soit de la macération purifiée (A + B) pour hydrolyser le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium. La solution de glyocolle introduite est préalablement ramenée aux pH optima d'hydrolyse de ces deux substrats. Nous avons opéré selon notre schéma général d'expérience. Voici les résultats obtenus exprimés en p. 100 d'hydrolyse.

TABLEAU XXVI. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des phosphatases intestinales brutes et purifiées vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence de glyocolle.*

Concentration en glyocolle	Enzyme brut		Enzyme purifié A + B	
	β -glycéro- phosphate	Pyro- phosphate	β -glycéro- phosphate	Pyro- phosphate
0	28,6	8,7	25,2	5,45
M/ 500	27,9	8,3	28,0	5,5
M/ 250	27,6	8,3	28,8	5,65
M/ 125	27,6	8,7	28,0	5,45
M/ 50	27,6	8,7	28,0	5,5

Le glyocolle, sans action sur la pyrophosphatase, active légèrement la phosphoestérase purifiée, mais non l'enzyme brut, ce qui tient à la présence dans la solution de produits d'autolyse.

Phosphatases hépatiques.

Nous avons utilisé une macération hépatique purifiée (B). Les valeurs trouvées sont indiquées ci-dessous.

Glycocolle	β -Glycérophosphate	Pyrophosphate
0	5,65	0,49
M/500	4,2	0,49
M/250	3,92	0,49
M/125	2,48	0,49
M/50	0	0,67

Dans ce cas, la pyrophosphatase demeure toujours insensible à l'action du glycocolle, mais la phosphoestérase paraît inhibée.

Phosphoestérase osseuse.

Avec les os d'embryon de Mouton, nous avons effectué seulement l'hydrolyse du β -glycérophosphate avec l'enzyme brut et avec l'enzyme purifié selon (A). Nous avons pu observer une action légèrement activatrice. Les résultats obtenus figurent dans le tableau XXVII.

Phosphatases rénales.

Nous avons effectué l'hydrolyse du pyrophosphate et du β -glycérophosphate de sodium en présence de glycocolle par les phosphatases brutes dialysées et purifiées selon (A).

TABLEAU XXVII. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des phosphatases osseuses et rénales brutes et purifiées vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence de glycocolle.*

Concentration en glycocolle	Phosphatases osseuses		Phosphatases rénales			
	β -Glycérophosphate		Macération brute		Macération purifiée	
	Enzyme brut	Enzyme purifié (A)	β -Glycéro.	Pyro.	β Glycéro.	Pyro.
0	23,8	18,0	35,0	5,1	43,5	5,25
M/2000	25,2	19,4	—	—	—	—
M/1000	26,6	22,4	33,8	5,1	43,5	5,7
M/500	26,6	—	32,0	4,9	42,0	5,25
M/250	26,6	22,4	30,5	4,9	43,5	5,25
M/100	22,4	28,0	28,0	5,1	39,4	5,65

S'il est intéressant d'étudier l'action des acides aminés agissant tout seuls, il l'est encore davantage d'étudier leur action couplée avec celle des métaux.

BODANSKY [15] déjà, a montré que le degré d'activation des phosphatases par le magnésium est augmenté par la présence d'un acide aminé.

De leur côté, HOVE, ELVEHJEM et HART [41] ont étudié l'action du zinc seul ou en présence d'alanine, sur les phosphatases intestinales. Pour ces auteurs, le zinc active les préparations brutes de phosphatase intestinale de Rat et les acides α aminés agissent comme coactivateurs du zinc. C'est ainsi que le zinc seul active les phosphatases intestinales, mais l'activation est beaucoup plus grande en présence d'alanine.

Reprenant ces expériences mais en se servant comme matériel d'étude à la fois d'intestin de Chien et de Rat nous avons pu constater le fait suivant : c'est que le zinc active bien la macération brute d'intestin de Rat et l'inhibe lorsqu'elle est dialysée, mais elle inhibe les phosphatases intestinales de Chien dans un cas comme dans l'autre.

D'ailleurs voici les résultats trouvés :

TABLEAU XXVIII. — *Activité phosphatasique relative* (p. 100 substrat hydrolysé) *des phosphatases intestinales brutes ou dialysées de Chien et de Rat vis-à-vis du β -glycérophosphate de sodium en présence de Zinc, de Magnésium et d'Alanine.*

Essai	p. 100 d'hydrolyse				p. 100 d'activation (+) ou d'inactivation (-)			
	Chien		Rat		Chien		Rat	
	Enzyme brut	Enzyme dialysé	Enzyme brut	Enzyme dialysé	Enzyme brut	Enzyme dialysé	Enzyme brut	Enzyme dialysé
Témoin.....	5,35	1,66	27,4	29,2				
Zn ⁺⁺ 0,01 mM....	4,65	—	—	25,9	-13,0	—	—	-11,3
0,03 mM....	3,54	1,4	33,8	22,8	-34,0	-15,6	+23,6	-21,8
0,05 mM....	2,46	—	—	18,4	-54,0	—	—	-37,0
0,07 mM....	2,0	—	—	18,4	-62,5	—	—	-37,0
Mg ⁺⁺ 0,1 mM....	6,60	4,35	41,5	29,8	+23,5	+162,0	+52,5	+2,0
Alanine 1 mM....	6,60	6,2	28,4	35,8	+23,5	+274,0	+3,7	+22,6
Zn ⁺⁺ 0,03 mM....								
+ Mg ⁺⁺ 0,1 mM....	7,85	3,86	40,0	39,8	+47,0	+132,0	+46,5	+36,4
Zn ⁺⁺ 0,03 mM....								
+ Alanine 1 mM....	4,6	5,0	40,0	33,4	-14,0	+200,0	+46,5	+14,4

Ces données concordent bien avec celles établies par HOVE, ELVEHJEM et HART en ce qui concerne l'action coactivatrice des acides aminés ; après dialyse, c'est-à-dire après élimination des acides aminés, l'effet du zinc est inversé, on observe alors une inhibition très nette dans le cas du Rat. Les résultats ne sont pas identiques avec les différentes espèces envisagées. Alors que l'enzyme dialysé d'intestin de Chien est plus fortement activé que l'enzyme brut par l'alanine, le magnésium, les couples zinc + magnésium et zinc + alanine, c'est l'enzyme brut du Rat qui est le plus sensible à ces activateurs.

G. — Action des oxalates et des fluorures alcalins.

Nous avons étudié l'action des oxalates et des fluorures alcalins sur les différents systèmes enzymatiques.

Enzymes intestinaux.

Nous avons comparé l'action de l'oxalate de potassium et du fluorure de sodium sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par les phosphatases intestinales brutes. Voici les résultats obtenus exprimés en p. 100 d'hydrolyse du substrat.

TABLEAU XXIX. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des phosphatases intestinales brutes dialysées vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'oxalate de potassium ou de fluorure de sodium.*

Concentration d'oxalate de potassium ou de fluorure de sodium	β -glycérophosphate de sodium		Pyrophosphate de sodium	
	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium
0	21,9	21,0	23,2	21,0
M/2000	21,9	21,4	23,0	24,8
M/1000	21,9	21,9	23,0	25,4
M/500	21,0	21,4	22,8	25,4
M/250	21,4	22,2	23,8	27,7
M/100	21,4	22,2	21,6	22,7
M/50	21,4	22,2	23,3	25,8

Le fluorure de sodium semble activer très légèrement l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium et l'oxalate de potassium est pratiquement sans action.

Dans une série d'expériences nous avons voulu observer si les fluorures et les oxalates alcalins déplaçaient les pH optima d'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium.

TABLEAU XXX. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des phosphatases intestinales brutes dialysées vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium à différents pH et en présence d'oxalate de potassium ou de fluorure de sodium.*

pH	β - glycérophosphate de sodium		Pyrophosphate de sodium	
	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium
6,9	17,8	17,8	—	—
7,1	—	—	9,4	10,0
7,3	20,1	23,0	10,0	11,8
7,6	24,1	25,1	11,6	12,9
7,8	24,3	26,9	13,7	14,5
8,0	30,0	32,1	14,8	16,9
8,2	37,0	40,0	18,8	19,1
8,4	40,1	43,0	20,2	19,1
8,6	45,5	45,0	20,2	18,3
8,8	44,5	47,5	14,5	15,8
9,0	52,5	48,5	13,2	15,0
9,15	48,0	49,5		

L'oxalate de potassium et le fluorure de sodium n'ont pas d'influence sur les pH optima d'hydrolyse des deux substrats envisagés.

Enzymes hépatiques.

Nous avons envisagé l'action de l'oxalate de potassium et du fluorure de sodium sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les enzymes hépatiques bruts et purifiés ; nous avons groupé dans le tableau suivant les résultats obtenus :

TABEAU XXXI. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des phosphatases hépatiques brutes et purifiées vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'oxalate de potassium ou de fluorure de sodium.*

Concentration en oxalate de potassium ou en fluorure de sodium	β -Glycérophosphate de sodium		Pyrophosphate de sodium	
	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium
I. — Enzyme brut.				
0	5,25	6,3	4,55	4,75
M/2000	4,9	6,3	4,55	4,75
M/1000	5,9	5,5	4,35	4,55
M/500	5,6	5,5	4,55	3,85
M/250	5,9	5,5	4,35	4,22
M/100	5,25	5,25	4,55	4,22
II. — Enzyme purifié.				
0	10,0	10,2	3,84	4,0
M/2000	9,5	9,5	4,2	3,85
M/1000	9,5	9,1	3,84	3,96
M/500	9,15	8,3	3,84	3,85
M/250	9,15	8,7	3,84	3,68
M/100	9,15	8,7	4,0	3,85

L'oxalate de potassium n'a pas d'action sur l'hydrolyse des substrats étudiés et le fluorure de sodium a un effet légèrement inhibiteur.

Enzymes osseux.

Nous avons répété avec les enzymes osseux bruts et purifiés les expériences qui avaient été faites avec les enzymes hépatiques.

L'oxalate de potassium inhibe plus fortement l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par les enzymes purifiés que celle du pyrophosphate de sodium. Cette différence disparaît lorsque l'hydrolyse des deux substrats est effectuée par l'enzyme brut.

Le fluorure de sodium n'agit pas de la même manière en présence des enzymes bruts et des enzymes purifiés ; alors

qu'il est sans action sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par l'enzyme brut, il devient légèrement activateur après purification de celui-ci. Son action sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium est plus irrégulière.

TABLEAU XXXII. — *Activité phosphatasique relative* (p. 100 substrat hydrolysé) *des phosphatases osseuses brutes et purifiées vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'oxalate de potassium ou de fluorure de sodium.*

Concentration en oxalate de potassium ou en fluorure de sodium	β -Glycérophosphate de sodium		Pyrophosphate de sodium	
	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium
I. — Enzyme brut.				
0	12,9	11,9	14,3	12,2
M/2000	12,9	12,9	12,4	10,5
M/1000	13,7	12,6	10,5	11,6
M/500		12,9	12,4	9,8
M/250	12,2	12,6	12,4	12,4
M/100	9,7	11,3	10,5	12,4
II. — Enzyme purifié.				
0	84,0	68,0	14,3	12,2
M/2000	84,0	77,0	14,3	10,5
M/1000	85,0	78,5	12,1	11,6
M/500	77,0	74,0	15,8	9,8
M/250	69,5	74,0	21,4	12,4
M/100	63,5	74,0	14,3	12,4

Phosphatases rénales.

Les fluorures et oxalates alcalins agissent très faiblement sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium, par les phosphatases rénales brutes et purifiées, comme le montrent les résultats indiqués ci-dessous :

TABLEAU XXXIII. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des phosphatases rénales brutes et purifiées vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'oxalate de potassium ou de fluorure de sodium.*

Concentration en oxalate de potassium ou en fluorure de sodium	β -Glycérophosphate de sodium		Pyrophosphate de sodium	
	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium	Oxalate de potassium	Fluorure de sodium
I. — Enzyme brut.				
0	35,0	35,0	4,75	4,75
M/2000	32,2	35,0	4,9	4,55
M/1000	35,0	35,0	4,9	4,5
M/500	32,2	35,0	4,9	4,5
M/250	30,8	35,0	4,55	4,35
M/100	28,0	32,2	4,55	3,86
II. — Enzyme purifié.				
0	48,0	49,0	5,8	5,95
M/2000	50,5	51,0	5,8	6,15
M/1000	50,5	53,0	5,95	6,50
M/500	50,5	53,0	6,30	5,95
M/250	46,5	52,0	5,95	5,95
M/100	46,5	51,0	6,25	5,95

Le fluorure de sodium est pratiquement sans action. L'oxalate de potassium inhibe plus fortement l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par l'enzyme brut que par l'enzyme purifié, mais n'a pas d'action marquée sur l'hydrolyse du pyrophosphate.

Enzymes des globules blancs.

Avec la préparation de globules blancs de sang de Cheval nous avons fait deux séries d'expérience, en utilisant comme substrat l' α -glycérophosphate d'une part, et le β -glycérophosphate d'autre part.

Nous avons opéré non plus en fonction de quantités croissantes d'oxalate de potassium ou de fluorure de sodium, mais en présence d'une quantité fixe de ces corps qui était de 2 cm³ de solution M/10 de chacun d'eux (essai = 10 cm³) et en fonction du pH.

Pour chacun de ces substrats nous avons établi 3 courbes à

savoir : une courbe témoin ; une courbe en présence d'oxalate de potassium ; une courbe en présence de fluorure de sodium.

TABLEAU XXXIV. — *Activité phosphatasique relative (p. 100 substrat hydrolysé) des phosphatases leucocytaires vis-à-vis du β -glycérophosphate et de l' α -glycérophosphate de sodium en l'absence ou en la présence d'oxalate de potassium ou de fluorure de sodium.*

pH	Témoin		Oxalate de potassium		Fluorure de sodium	
	β - glycéro- phosphate de sodium	α - glycéro- phosphate de sodium	β - glycéro- phosphate de sodium	α - glycéro- phosphate de sodium	β - glycéro- phosphate de sodium	α glycéro- phosphate de sodium
3,8	3,6	3,18	3,72	4,08	3,96	3,96
4,6	3,4	3,18	3,84	2,52	3,96	4,5
5,6	3,9	3,18	3,9	3,36	3,96	3,7
6,7	6,7	5,40	5,64	4,08	6,24	5,1
7,2	22,5	17,40	15,8	11,40	22,8	19,2
7,8	61,2	63,0	39,0	36,60	54,0	48,0
8,0	47,4	39,0	41,6	30,6	58,8	43,5
9,1	55,8	27,0	28,1	28,2	42,6	32,1
9,3	2,5	2,4	2,7	2,74	3,48	3,0

Aux pH optima d'hydrolyse du β -glycérophosphate et de l' α -glycérophosphate de sodium, le fluorure de sodium agit comme activateur, tandis que l'oxalate de potassium inhibe l'hydrolyse du β -glycérophosphate et n'agit pas sur celle de l' α -glycérophosphate de sodium.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II.

Deux points principaux méritent d'être retenus, à savoir : les effets activateurs ou inhibiteurs de divers corps et l'inégalité de leur action sur les phosphatases de divers organes.

I. — *Action inhibitrice ou activatrice de divers corps.* — Comme nous l'avons conclu à la fin des paragraphes relatifs à chaque produit étudié, certains corps exercent sur l'activité phosphatasique une action nette tandis que d'autres sont à cet égard inefficaces.

Parmi les activateurs, le magnésium est le plus général et l'effet observé est certainement un caractère de la phospho-estérase et de la pyrophosphatase alcalines. De même, parmi

les inhibiteurs, les thiols sont d'une efficacité constante, très forte sur la phosphoestérase, moindre sur les pyrophosphatases. Enfin les acides biliaires inhibent toutes les phosphatases A_1 , mais sont très peu actifs sur celle de l'intestin. Par contre les effets de tous les autres corps étudiés sont irréguliers ou ne se manifestent pas sur les enzymes extraits de tous les organes, ceci pour des raisons que nous discuterons plus bas.

Les oxalates, inactifs sur les pyrophosphatases, inhibent fortement les phosphoestérases des os et des globules blancs, faiblement celle du foie et du rein ; celle de l'intestin est indifférente à leur présence. Les fluorures ne sont faiblement inhibiteurs que vis à vis de l'estérase du foie et de l'intestin et de la pyrophosphatase hépatique. Les acides biliaires fortement inhibiteurs des estérases de l'os, du rein, du foie ne le sont que faiblement de celle de l'intestin et, parmi les pyrophosphatases, seule celle du rein présente le même caractère d'inhibition. L'acide ascorbique activateur faible des phosphoestérases rénale, intestinale, hépatique, gêne l'action de celle de l'os. De même l'inhibition qu'il exerce à faible dose sur la pyrophosphatase intestinale ne se retrouve pas dans les extraits rénaux. Quant aux irrégularités de l'activation des phosphoestérases par les acides aminés, elle peut s'expliquer par l'inégalité de teneur en produits d'autolyse des diverses préparations, même après une dialyse relativement rapide.

Enfin il n'est pas possible de mettre en évidence une action systématique des oxydants et des réducteurs sur ces enzymes, bien que, très souvent une faible action activatrice des oxydants se manifeste. Il est possible qu'elle soit dûe à la présence d'inhibiteurs naturels détruits par le réactif et existant à des taux divers dans les préparations. C'est ainsi, par exemple, que la transformation des thiols (SH) en sulfures ($-S-S-$) en présence d' H_2O_2 ou d'acide monoiodacétique diminue fortement leur effet inhibiteur.

En définitive on peut schématiser de la manière suivante les principaux effets activateur (+) ou inhibiteur (—) que nous avons observés.

Organe		M_{P}^{++}	— SH	Oxalates	Fluorures	Acides biliaires	Acide ascorbique	Acides amrés
Phospho- estérase	Foie.....	+	—	—	— (?)	—	+	
	Globules blancs ..	+	—	—	—	—	+	
	Intestin	+	—	0	— (?)	—	+	+
	Os.....	+	—	—	0	—	—	+
	Rein	+	—	—	0	—	+	
Pyro- phosphatase	Foie.....	+	— (?)	0	0	0	0	
	Intestin	+	—	0	0	0	0	
	Os	+	— (?)	0	0	0	0	
	Rein	+	—	0	0	—	0	

Ces résultats posent la question de la diversité des phosphatases dans les différents organes d'autant que les caractères qu'ils traduisent sont ceux d'enzymes dont la purification ne modifie pas sensiblement le comportement vis à vis des réactifs étudiés.

II. — *Existe-t-il diverses phosphoestérases et diverses pyrophosphatases alcalines ?* — Les travaux de BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI, de BODANSKY, ont posé la question de la diversité des phosphomonoestérases alcalines, les pyrophosphatases n'ayant fait à cet égard l'objet d'aucune étude comparée. Mais, s'il se dégage de leurs recherches l'idée que tous les organes ne renferment pas la même phosphoestérase, leurs conclusions ne présentent pas une homogénéité parfaite. En effet, pour les premiers, il y aurait deux types de phosphatase alcaline: I os et sérum, II foie et rein. Pour les seconds, l'enzyme de l'intestin différerait de celui des os et du rein, lesquels seraient identiques, tout au moins en ce qui concerne leur sensibilité aux acides biliaires.

Or, s'il ne nous semble pas que la phosphatase intestinale soit absolument insensible à l'acide cholique, du moins l'est-elle beaucoup moins que celles d'autres organes, ce qui lui confère un caractère particulier. Mais, par ailleurs, il est indiscutable que l'enzyme des os présente un comportement exceptionnel vis à vis de celui des autres organes : il est fortement inhibé par les oxalates (1), inefficaces sur celui de l'in-

(1) Comme le sont aussi celui du sérum et des globules blancs, dont on n'a pas fait une étude approfondie.

testin et faiblement activateurs sur celui du rein et du foie ; il est très sensible aux acides biliaires et aux acides aminés, inhibé par l'acide ascorbique, qui active les autres enzymes isodynates alcalins. En somme, si l'on devait diviser provisoirement les enzymes A₁, on pourrait en distinguer trois types : I intestin, II os, III foie et rein.

En ce qui concerne les pyrophosphatases, des différences se manifestent aussi d'un organe à l'autre : l'enzyme intestinal est beaucoup plus sensible que les autres à l'action défavorable des thiols et celui du rein est, contrairement aux autres, inhibé par les acides biliaires. La question se pose de savoir ce que traduisent ces différences. Comme elles persistent après purification des enzymes, on peut en première approximation les rattacher à la nature de ceux-ci et non à des produits naturels les accompagnant. Deux hypothèses peuvent rendre compte des faits observés. On peut soit penser avec CLOETENS que les divers organes renferment des mélanges de plusieurs (deux) enzymes en proportions diverses, soit que chaque organe contient une phosphatase particulière. Il est prématuré de choisir de manière formelle entre ces deux hypothèses. La première ne peut pas actuellement être vérifiée. Quant à la seconde, elle nous semble plus plausible. On conçoit en effet sans difficulté que les diverses phosphoestérases alcalines aient un même coenzyme et des apoenzymes spécifiques de chaque organe. Les récents travaux de SZENT-GYÖRGY [81] et de son école ont à nouveau attiré l'attention sur l'existence dans les divers organes de protéines particulières à chacun et il est dès lors possible que la partie protéique des phosphatases ait une constitution différente dans les divers organes, ce qui expliquerait les différences de sensibilité de ces enzymes selon leur origine. Quoi qu'il en soit nos recherches apportent de nouveaux arguments en faveur de la diversité des phosphoestérases alcalines dans l'os, l'intestin, le foie et le rein et elles indiquent que les pyrophosphatases alcalines dans les organes ne sauraient plus être considérées comme rigoureusement identiques.

CHAPITRE III.

ACTION DES ACTIVATEURS ET DES INHIBITEURS DE L'HYDROLYSE DES ESTERS PHOSPHORIQUES SUR LEUR SYNTHÈSE ENZYMATIQUE.

Nous exposerons brièvement dans ce chapitre quels sont les corps qui peuvent agir sur la synthèse du glycérophosphate de Na par les phosphatases non purifiées de la muqueuse intestinale, les essais de synthèse par l'enzyme purifié ayant échoué.

Nous établirons ensuite un parallèle entre l'action de chacun de ces corps sur l'hydrolyse et la synthèse d'un même ester.

TECHNIQUE DES ESSAIS.

Les données sur lesquelles nous nous sommes basés sont celles formulées par KAY [48].

L'enzyme intestinal réagit à 37° sur un mélange de phosphate disodique et de glycérol à un pH déterminé. Des prélèvements opérés immédiatement, puis tous les jours ou tous les deux jours permettent de doser la quantité de phosphore libre, laquelle diminue constamment jusqu'au moment de l'équilibre.

L'addition de corps oxydants, réducteurs ou autres à ce milieu, modifie la vitesse de réaction, qui est activée, inhibée, ou inchangée selon la nature du composé mis en expérience.

Protocole expérimental : un gramme de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$. 12 H_2O est dissous dans 10 cm^3 d'extrait de muqueuse intestinale dialysée non purifiée, préparée selon le mode indiqué. Cette solution est additionnée de 16 cm^3 de glycérol pur. Le mélange a un pH de 7,6. Les différents corps dont on étudie l'action sur

la réaction sont ajoutés en solution aqueuse, préalablement ramenée à $\text{pH} = 7,6$.

De ce mélange homogène on prélève immédiatement un échantillon de 1 cm^3 qui est déprotéinisé à l'aide de 2 cm^3 d'acide trichloracétique à 10 p. 100. On filtre. Le phosphore libre est dosé sur une partie aliquote du filtrat (photomètre de Pulfrich).

Ce premier prélèvement fait, les divers échantillons sont portés en même temps à l'étuve à 37° , où ils séjournent pendant une semaine. Des prises d'essais de chacun des échantillons sont effectuées tous les jours, puis tous les deux jours dans les mêmes conditions (même matériel) et le phosphore libre est dosé sur chaque filtrat de déprotéinisation.

Les pH des différents essais ont été contrôlés à chaque prélèvement.

Nous donnerons les résultats en pour cent du phosphore total ayant participé à la formation de l'ester (1).

Tous nos essais ont été faits en double, les moyennes seules figurant dans les tableaux.

1°. — *Essai de synthèse type.* — Ce premier essai a consisté à confirmer l'action synthétisante de la phosphatase intestinale à partir du phosphate disodique, et du glycérol à $\text{pH} = 7,6$. Cette action produit un mélange de glycérophosphates avec prédominance du dérivé α .

L'expérience a été menée d'une façon rigoureusement conforme à celle indiquée précédemment, les prélèvements étant faits tous les deux jours. Le dosage du P libre a permis de constater une nette diminution de ce dernier, comme l'indiquent les résultats suivants :

TABLEAU XXXV. — *Pourcentage de P estérifié en fonction du temps par la phosphatase alcaline de l'intestin.*

Jours de synthèse	0	2	4	6	8
p. 100 P estérifié.....	0	8,6	27,0	40,0	36,0

(1) Il n'a pas été possible d'opérer en présence de phosphates à concentration élevée, en raison de l'action inhibitrice de l'ion $\text{PO}_4^{=}$ sur la synthèse comme sur l'hydrolyse des esters.

Après le sixième jour, l'équilibre doit être atteint, si l'on compare nos valeurs à celles de KAY [48]. Il arrive souvent qu'après six jours P estérifié diminue, ce qui tient sans doute à l'inactivation spontanée de l'enzyme, provoquant un déplacement de l'équilibre, par diminution du taux des combinaisons de l'enzyme aux produits de la réaction.

2°. — *Action du pH.* — Pour le premier essai, nous nous sommes placés à $pH = 7,6$; nous avons répété la même expérience à divers pH , égaux respectivement à 6,7 - 7,8 - 8,2 et 9,0 en milieu tamponné. Les résultats obtenus montrent que dans cette zone, le pH est sans action nette sur la vitesse de réaction ; toutefois, au bout d'un séjour de trois jours à l'étuve tous les pH se sont stabilisés vers 7,6 et 7,8.

3°. — *Action de Mg^{++} .* — L'action du magnésium est très faiblement activatrice, pour une concentration de $qMg = 3-4$ et faiblement inhibitrice pour $qMg = 2$. Au delà de cinq à six jours de synthèse, c'est-à-dire quand l'équilibre est atteint, la courbe ascendante représentant le pourcentage de phosphore synthétisé en fonction du temps, présente une diminution (quatre expériences).

Cette constatation a été faite au cours de la plupart de nos essais ; aussi pour chacun d'eux nous ne mentionnerons que les résultats obtenus pendant les quatre premiers jours de la synthèse, temps au bout duquel le pourcentage de phosphore synthétisé varie entre 20 et 30 p. 100. Le tableau suivant, est relatif à l'action de Mg^{++} aux concentrations de qMg 2 et 4 sur la vitesse de réaction de la synthèse.

TABLEAU XXXVI. — *Pourcentage de P estérifié en fonction du temps et en présence de SO_4Mg à diverses concentrations.*

Jours de synthèse	0	2	5	7	9
Témoin	0	17,0	19,8	19,8	25,0
$qMg = 2$	0	13,0	15,2	15,0	20,6
$qMg = 3$	0	16,0	20,8	22,0	26,0
$qMg = 4$	0	19,1	23,2	25,0	26,0

Mg^{++} est activateur à $qMg = 4$ et plutôt inhibiteur à $qMg = 2$, ce qui peut tenir à la diminution de la dissociation des ions $PO_4^{=}$ qu'il provoque alors.

4°. — *Action des réducteurs et des oxydants.* — En nous plaçant toujours dans les mêmes conditions, nous avons étudié l'action de divers réducteurs (acide ascorbique, cystéine, glutathion, SH_2 , sulfite) et oxydants (eau oxygénée, ferricyanure) sur la synthèse des glycérophosphates de Na, à partir du phosphate disodique et du glycérol, par les phosphatases brutes de la muqueuse intestinale. Ces différents corps ont été introduits sous forme de solutions ramenées à pH 7,6. Les concentrations respectives de ces corps dans le mélange synthétisant sont : 5 mg. d'acide ascorbique par cm^3 , 2 mg. de cystéine par cm^3 , 2 mg. de cystine par cm^3 , 0,1 cm^3 de solution saturée de SH_2 par cm^3 . Le sulfite de Na, l'eau oxygénée et l'acide cholique ont été employés à la concentration $M/250$, le ferricyanure de K à la concentration $M/1000$.

Un premier prélèvement a été effectué immédiatement sur le mélange homogène, puis trois autres après 24 heures, 48 heures et 4 jours de séjour à l'étuve à 37°, le milieu contenant encore de l'acide ascorbique, de la cystéine ou du glutathion (G-SH) non oxydés en fin d'expérience. Le phosphore libre a été dosé et les pourcentages de phosphore synthétisé calculés à partir de ces données ont été mentionnés dans le tableau suivant :

TABLEAU XXXVII. — *Pourcentage de P estérifié en fonction du temps et en présence de divers corps oxydants ou réducteurs.*

Jours de synthèse	0	1	2	4
Témoin.....	0	10,4	20,9	22,0
Acide ascorbique.....	0	6,4	16,9	27,4
Cystéine.....	0	0	3,2	10,2
Glutathion.....	0	6,4	27,4	27,4
SH_2	0	0	6,4	16,9
$\text{SO}_3 \text{ Na}_2$	0	8,8	15,5	22,0
KCN.....	0	9,0	16,6	—
H_2O_2	0	15,3	16,9	27,4
$\text{Fe Cy}_6 \text{ K}_3$	0	15,3	25,0	27,4

Ces résultats sont un exemple choisi parmi quatre séries d'expériences donnant des résultats identiques. Nous les interpréterons de la façon suivante :

1) Action faiblement inhibitrice de l'acide ascorbique au début de la synthèse, qui semble légèrement activatrice par la suite.

2) La cystéine a un effet nettement inhibiteur sur la synthèse enzymatique.

3) Le glutathion inhibe au début, puis active par la suite.

4) SH_2 retarde la synthèse, mais son action est moins accusée que dans le cas de la cystéine.

5) Le sulfite de sodium est faiblement inhibiteur.

6) Le ferricyanure de potassium et à un degré moindre, l'eau oxygénée favorisent la synthèse.

Deux expériences semblables faites sur la cystine indiquent que son action est nulle.

D'autre part, nous avons essayé de coupler l'action du cuivre et de la cystéine (2 expériences). Cette dernière, en présence de cuivre est rapidement oxydée et son action inhibitrice ne semble avoir lieu qu'au moment de l'équilibre, ce qui peut tenir à sa réduction.

TABLEAU XXXVIII. — Pourcentages de *P* estérifié en fonction du temps et en présence de cystine ou de cystéine + Cu^{++} .

Jours de synthèse	0	1	2	3	5
Témoin	0	17	15	17	26
Cystine.....	0	20	17	17	20
Cystine + Cu^{++}	0	18	17	17	17

5°. — *Action d'autres corps divers.* — L'action de l'acide cholique (4 expériences) et de la phlorhidzine (3 expériences) a également été étudiée.

Le tableau suivant montre le pouvoir activateur de l'acide cholique sur la synthèse enzymatique.

TABLEAU XXXIX. — Pourcentage de *P* estérifié en fonction du temps et en présence d'acide cholique.

Jours de synthèse	0	1	2	4
Témoin	0	10,4	20,9	22,0
Acide cholique	0	12,0	24,0	27,0

Quant à la phlorhidzine, son action est nulle.

En résumé, de même que nous l'avons remarqué au cours de l'étude faite sur l'hydrolyse, les oxydants et les réducteurs n'ont pas d'action systématique certaine sur la synthèse du glycérophosphate de Na par les phosphatases non purifiées de la muqueuse intestinale. Cependant, dans le même groupe de corps, soit oxydants, soit réducteurs, nous ne constatons pas d'actions opposées. Les effets observés sont nuls ou inhibiteurs dans le cas de divers réducteurs ; nul ou activateur dans celui des oxydants.

Ces faits expliquent l'opinion de WALDSCHMIDT-LEITZ, de COURTOIS pour lesquels les conditions d'oxydoréduction du milieu joueraient un rôle très important dans la synthèse des esters phosphoriques par les enzymes. Toutefois il paraît certain que, dans le cas de quelques réducteurs étudiés, beaucoup plus actifs en tant qu'inhibiteurs que les oxydants en tant qu'activateurs, une action spécifique de ces corps doit se superposer à leur effet réducteur. Par ailleurs, ces corps s'autoxydent à des degrés divers au cours de l'expérience et il y a lieu de tenir compte de l'action éventuelle de leurs produits de transformation.

Le cas du glutathion (g - SH), plus ou moins inhibiteur au début de la synthèse, puis activateur, tandis que la cystéine demeure inhibitrice pendant tout le cours de la réaction témoigne de cette complexité. De même celui de l'acide ascorbique. On peut se demander si ces corps n'exercent pas une action multiple, d'une part en se combinant à l'enzyme et, d'autre part en réduisant ou en oxydant un groupement actif de celui-ci et enfin en donnant des complexes avec des traces de métaux participant à la constitution du coenzyme ou non. Tous les essais que nous avons poursuivis pour mettre en évidence un groupement thiol susceptible de participer à des réactions d'oxydoréduction dans les solutions de phosphomono-estérase ont échoué.

COMPARAISON ENTRE LA SYNTHÈSE ET L'HYDROLYSE DES ESTERS DU POINT DE VUE DE L'ACTIVATION ET DE L'INHIBITION.

La comparaison des actions de chacun de ces corps, sur la synthèse et l'hydrolyse du glycérophosphate de Na par les phosphatases brutes de la muqueuse intestinale a été établie d'après les résultats précédents.

Nous n'avons pas constaté d'actions systématiquement in-

verses sur la synthèse et sur l'hydrolyse. La cystéine par exemple est un inhibiteur de la synthèse et de l'hydrolyse (1). D'autres corps tels que la cystine, le sulfite de Na et l'eau oxygénée, n'ont aucun effet important sur l'un et l'autre processus enzymatiques. Mg^{++} est faiblement activateur ($qMg = 3$) de l'hydrolyse et de la synthèse.

Ces exemples mis à part, l'étude des autres composés permet d'envisager une différence entre leur action sur la synthèse et sur l'hydrolyse.

Dans le cas de la synthèse le pourcentage d'ester synthétisé est très peu sensible au pH, alors que dans celui de l'hydrolyse, l'optimum se localise à un pH déterminé.

L'acide ascorbique est inhibiteur de la synthèse, et activateur de l'hydrolyse. C'est le contraire qui a lieu pour les cyanures et l'acide cholique.

Ces résultats sont résumés dans le schéma suivant :

TABLEAU XL. — Action comparée de divers corps sur la synthèse et sur l'hydrolyse des glycérophosphates par la phosphomonoestérase intestinale.

Corps étudié	Synthèse	Hydrolyse
Mg^{++} ($qMg = 3$)		
Acide ascorbique 5 mg par cm^3		
Cystéine 2 mg par cm^3		
Cystéine + Cu^{++} , 2 mg par cm^3		
Cystine..... 2 mg. par cm^3		
SH_2 0 cm^3 l sol. saturée par cm^3 ..		
SO_3Na_2 V/ 250...		
H_2O_2 M/ 250...		
Fe Cy_6K_3 M/1000...		
Acide cholique M/ 250...		
Phlorhizine.....		

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III.

La synthèse des glycérophosphates par la phosphomonoestérase intestinale brute est susceptible d'être activée ou in-

(1) Ce qui est un nouvel argument en faveur de l'existence d'une action *spécifique* des thiols, due probablement à leur combinaison à l'enzyme, et non à une action indirecte de ceux-ci, telle que pourrait être l'hydrogénation d'un groupement spécifique de l'enzyme.

hibée par divers corps exerçant un effet sur la réaction inverse, ces corps ne modifiant pas sensiblement la position de l'équilibre des constituants en présence, à la fin de la réaction.

Mg^{++} favorise la synthèse, mais à une concentration optimale plus faible ($qMg = 4$) que dans le cas de l'hydrolyse, ce qui peut tenir à un recul de la dissociation des phosphates dans le milieu en présence d'un excès d'ions Mg^{++} . La cystéine, H_2S , sont inhibiteurs de la synthèse comme de l'hydrolyse. L'acide ascorbique gêne la formation des esters de même que les sulfites et KCN, tandis que divers oxydants : H_2O_2 , Fe Cy_6K_3 la favorisent. Dans le cas particulier de l'acide ascorbique et du glutathion, on note d'abord une inhibition nette, puis une activation de ce processus, ce qui traduit probablement la multiplicité des effets de ces corps. L'acide cholique favorise la synthèse, sur laquelle le phlorhidzocide est inefficace.

Somme toute, la formation enzymatique des glycérophosphates *in vitro* est soumise à l'influence d'un ensemble de facteurs paraissant encore plus complexes que ceux modifiant la vitesse de l'hydrolyse. *Une action générale des oxydants et des réducteurs apparaît comme probable, les premiers favorisant la réaction, les seconds gênant son évolution. Elle va de pair avec des actions spécifiques de divers oxydants ou réducteurs, actions qui se manifestent identiquement sur la synthèse et sur l'hydrolyse des esters ;* tel est le cas de celle de la cystéine.

En outre certains inhibiteurs de l'hydrolyse sont des activateurs de la synthèse, comme l'acide cholique.

Si l'influence générale des oxydants et des réducteurs, particulière à la synthèse, peut faire penser à l'existence d'une phosphatase (estérifiante) distincte de la phosphatase (hydrolysante), l'action spécifique des divers agents étudiés sur les deux réactions inverses est favorable à l'opinion qu'un seul enzyme opère la synthèse et l'hydrolyse des esters. C'est cette opinion que nous proposons d'adopter.

NOTE TECHNIQUE.

Dans le cas où le dosage de l'activité phosphatasique a du être fait en présence d'acide ascorbique, il s'est présenté une difficulté particulière, déjà signalée par KING et DELORY [51], à savoir que l'acide ascorbique donne naissance avec les réactifs utilisés à une coloration bleue.

En réalité, cette coloration ne se manifeste que pour des quantités d'acide ascorbique supérieures à 0,2, 0,3 mg. dans la prise d'essai et, sauf pour des quantités dépassant 1 mg., il peut, en être tenu compte à l'aide d'une courbe témoin que nous avons établie.

Nous nous sommes efforcés de nous placer dans des conditions expérimentales où la présence d'acide ascorbique ne pouvait pas intervenir dans l'appréciation de l'activité phosphatasique. Dans les cas les plus défavorables, nos résultats n'ont pu être modifiés qu'en ce qui concerne la grandeur des activations ou des inhibitions, mais non dans le sens (diminution ou augmentation) des modifications dues à l'acide ascorbique.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

1. — La phosphoestérase et la pyrophosphatase alcalines des cellules animales (foie, intestin, os, rein, globules blancs) sont deux enzymes se différenciant par un ensemble de caractères, entre autres par leurs pH optimum d'action et leurs activateurs ou inhibiteurs respectifs.

2. — Il a été possible de purifier la phosphoestérase et la pyrophosphatase alcalines par adsorption et élution et par précipitation alcoolique ou acétonique ; ces deux méthodes de purification ont été également combinées. Dans tous les cas, le comportement des enzymes vis à vis des activateurs et des inhibiteurs n'est pas très sensiblement modifié par l'élimination des impuretés naturelles. Aucune des méthodes employées n'a permis de séparer les deux enzymes, mais seulement de concentrer plus efficacement l'un que l'autre. L'adsorption sur kaolin à pH = 4,6 fixe à peu près également la phosphoestérase et la pyrophosphatase tandis que l'adsorption sur cholestérol à pH = 4,6 est beaucoup plus énergique sur le premier enzyme que sur le second. L'inactivation par la chaleur ou par séjour à certains pH, est pratiquement identique pour les deux enzymes ; toutefois la purification de ceux-ci réduit la marge de pH où leur stabilité est maxima ; pH 4 - 9 pour les phosphatases intestinales brutes, pH 4 - 6,8 après adsorption au kaolin à pH = 4,6 et élution ammoniacale à pH = 9,0.

3. — La répartition de la pyrophosphatase et de la phosphomonoestérase dans les divers organes n'est pas identique. Alors que l'intestin, le foie, le rein renferment les deux enzymes en abondance, avec un excès notable du premier, les os des embryons sont presque dépourvus de pyrophosphatase, mais riches en phosphoestérase.

4. — L'ion Mg^{++} active les deux enzymes dans tous les organes, toutefois à un degré moindre pour les desmo que pour les

lyoenzymes, et la purification renforce en général son effet favorable.

5. — Les thiols (cystéine, glutathion) sont fortement inhibiteurs de la phosphoestérase dans tous les organes, les dérivés disulfurés correspondants l'étant beaucoup moins ou sans action à des concentrations où les premiers exercent un effet défavorable très marqué. Les pyrophosphatases sont moins sensibles à la présence des thiols, et celle-ci ne provoque d'inhibition très nette que sur l'enzyme intestinal.

6. — L'acide ascorbique est un activateur très faible de la phosphoestérase de l'intestin, du foie, du rein, du sérum, mais non de l'os. A faible concentration il inhibe fortement la pyrophosphatase intestinale, cette action se manifestant à une concentration optimale au delà de laquelle elle devient moindre. L'acide déhydroascorbique est pratiquement sans action.

7. — Divers corps oxydants (eau oxygénée, acide monoiodacétique, ferriocyanures alcalins, iode, perborates alcalins) ou réducteurs (sulfites alcalins) possèdent une action minime et irrégulière, activatrice ou inhibitrice suivant les cas et paraissant secondaire à l'oxydation, à la réduction d'impuretés naturelles modifiant l'activité enzymatique. Tout se passe comme si la pyrophosphatase et la phosphoestérase étaient insensibles au potentiel d'oxydo-réduction du milieu, tout au moins entre des limites très larges.

8. — L'acide cholique est beaucoup plus fortement inhibiteur vis à vis de la phosphoestérase du foie, du rein, de l'os, que vis à vis de celle de l'intestin. Il inhibe faiblement la pyrophosphatase du foie, mais non celle des autres organes.

9. — L'action des acides aminés est activatrice à faible concentration vis à vis de la phosphoestérase intestinale et osseuse et inhibitrice à un taux plus élevé, le couplage de l'ion Zn^{++} et d'un acide aminé favorisant le premier de ces effets. Dans le cas des phosphoestérases d'autres organes, l'irrégularité des résultats obtenus peut être due à la présence des produits d'autolyse. Les pyrophosphatases ne sont pas sensibles à la présence des acides aminés.

10. — Les oxalates alcalins inhibent les phosphoestérases de l'os et des globules blancs, très faiblement celles du rein et du foie, et sont sans effet sur celle de l'intestin. Les pyrophosphatases ne sont pas sensibles à l'ion oxalique.

11. — Les fluorures alcalins, inhibiteurs de la phosphoestérase des globules blancs et, à un très faible degré de celles du foie et de l'intestin, sont à peu près sans action sur les pyrophosphatases de tous les autres organes étudiés à concentration élevée. A faible dose ils activent parfois légèrement les phosphoestérases de l'os, du rein, du foie, peut-être en éliminant le calcium, dont certains auteurs ont signalé l'effet inhibiteur.

12. — Les cyanures alcalins sont inhibiteurs des phosphoestérases, leur effet étant proportionnel à leur concentration dans le milieu. Par contre, ils exercent sur les pyrophosphatases une action activatrice lorsqu'ils sont présents à un faible taux et inhibitrice lorsque celui-ci s'élève. Ce fait permet de penser qu'ils agissent sur les pyrophosphatases d'abord en bloquant une impureté métallique inhibitrice, puis en se combinant à l'enzyme. L'inhibition des pyrophosphatases par les cyanures et par l'acide ascorbique pose le problème de la présence dans le coenzyme d'un métal susceptible de former des complexes avec les réactifs.

13. — La diversité de comportement des enzymes des organes étudiés est manifeste vis à vis des divers activateurs et inhibiteurs ; aussi doit-on envisager ou bien que ces phosphatases sont accompagnées dans les cellules de produits naturels spécifiques, qui les protègent inégalement vis à vis de l'activation ou de l'inhibition par d'autres produits, ou bien qu'ils sont différents. Le fait que la purification des enzymes par diverses méthodes ne modifie pas profondément leurs caractères est défavorable à la première hypothèse. Dès lors on peut envisager que les divers organes renferment des phosphoestérases et des pyrophosphatases alcalines constituées par un même coenzyme spécifique de chacun des deux types de substrat et d'un apoenzyme protéique particulier à chaque organe.

14. — La synthèse des glycérophosphates par la phosphomonoestérase intestinale est activée ou inhibée par un ensemble de corps, qui n'exercent aucun effet net sur la position de l'équilibre final des constituants du système. Mg^{++} favorise la synthèse ($qMg = 4$ optimum) comme l'hydrolyse. La cystéine, H_2S , KCN et les sulfites la gênent, tandis qu' H_2O_2 et $FeCy_6K_3$ la favorisent. L'action de l'acide ascorbique et du glutathion est plus complexe, ces corps étant inhibiteurs au début, puis activateurs. L'acide cholique accélère la formation des esters,

15. — La synthèse biologique des glycérophosphates paraît, comme l'indiquent ces faits, influencée à la fois par le caractère oxydant ou réducteur du milieu et par l'action spécifique de divers oxydants et réducteurs. En général, les oxydants étudiés ont favorisé la synthèse, tandis que les réducteurs la gênent. Mais les effets successivement inhibiteurs, puis activateurs de l'acide ascorbique et du glutathion témoignent probablement de l'existence de la pluralité des actions de ces corps sur l'enzyme. Il est toutefois difficile de préciser le mécanisme de l'activation et de l'inhibition.

16. — L'identité des effets de certains corps sur la synthèse et l'hydrolyse et les effets exactement antagonistes d'autres sur ces deux réactions sont favorables à l'opinion qu'un seul enzyme catalyse ces deux processus, et défavorables à l'existence d'une phosphatase synthétisante, soutenue par divers auteurs.

Marseille, le 24 juillet 1942.

Vu : *Le Président*,
JEAN ROCHE.

Aix-en-Provence, le 27 juillet 1942.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur,
PIERRE MARTINO.

Vu et approuvé :

Le Doyen,
LUCIEN CORNIL.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ALBERS (H.). — Phosphatasen, in *Handbuch der Enzymologie*, 2 vol., Akad. Verlagsges., éd., Leipzig, 1940, 1545 p., 408-479.
2. ALBERS (D.). — Ueber sogenannten Aktivoren der alkalischen Phosphatasen, *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1940, **266**, 1.
3. ALBERS (H.) und ALBERS (E.). — Ueber eine einfache Methode zur Darstellung hochaktiver Phosphatasepräparate aus tierischem Material. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1935, **232**, 189.
4. BAMANN (E.). — Ueber die Aktivierung von Phosphatasen durch das Mangan Ion. *Naturw.*, 1940, **28**, 142 et *Ibid.*, 3405.
5. BAMANN (E.) und DIEDERICH (K.). — Trennung der beiden isodynamen Phosphoesterasen tierischer Organe durch ein selektives Inaktivierungsverfahren. *Ber. d. dtsh. chem. Ges.*, 1934, **67**, 2019.
6. BAMANN (E.) und HEUMÜLLER. — Ueber die Aktivierung von Phosphatasen durch verschiedene Metallionen. *Naturw.*, 1940, **28**, 535.
- 7 - 8. BAMANN (E.), RIEDEL (E.) und DIEDERICH (K.). — Zur Freilegung der Phosphoesterasen aus der Leber (2 Abhandlung : Zur Kenntnis der Phosphatasen). *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1934, **230**, 175.
9. BAMANN (E.) und SALZER (W.). — Ueber die Mg-Aktivierung bei Phosphatasen. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, 1937, **70**, 1263.
10. BARRENSCHEEN (H. K.) und LANG (S.). — Zur Kenntnis der Adenosintriphosphatase der Leber. *Biochem. Ztschr.*, 1932, **252**, 395.
11. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Studies on the Phosphatases. I. The influence of some electrolytes on the phosphatases of animal tissue. Phosphatases of the liver, kidney, serum and bones of the rabbit. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 517.
12. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Researches on the Phosphatases. II. Inactivation and reactivation of the phosphatases of animal organs. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 842.
13. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Researches on the Phosphatases. III. On the mechanism of the inactivator action of sodium oxalate and of phosphates of the « alkaline » phosphatases of animal tissue. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1491.
14. BERSIN (T.). — *Kurzes Lehrbuch der Enzymologie*, 1 vol., Akad. Verlagsges., éd., B. H., Leipzig, 1938, 170 p.
15. BODANSKY (O.). — The effect of α -amino acids and magnesium on the activity of kidney and intestinal phosphatases. *Journ. of biol. Chem.*, 1936, **115**, 101.
16. BODANSKY (O.). — Are the phosphatases of bone, kidney, intestine and serum identical ? Use of bile acids in their differentiation. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, **118**, 341.

17. BODANSKY (O.). — The accelerator effect of α -amino acids on the activity of bone phosphatase. *Journ. of biol. Chem.*, 1936, **114**, 273.
18. BRAUNSTEIN (A. F.). — Phosphoglycerase der roten Blutkörperchen. *Biochem. Ztschr.*, 1934, **272**, 21.
19. CATTANEO (C.), GABRIELLI (M. C.) e SCOZ (G.). — Fosfatasi alcaline e attivazione in presenza dei sali di magnesio. *Enzymolog.*, 1937, **2**, 17.
20. CATTANEO (C.), GABRIELLI (M. C.) e SCOZ (G.). — Phosphatases and activation by magnesium salts II « Alkaline » phosphatase of the placenta. *Boll. Soc. ital. Biol. speriment.*, 1937, **12**, 37.
21. CEDRANGOLO (F.). — Glycerophosphatase of brain. *Boll. Soc. Ital. Biol. speriment.*, 1935, **10**, 374.
22. CLOETENS (R.). — Eigenschaften der alkalischen phosphatasen. II. Mit verschiedenen M_1 und M_2 freien Apophosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1941, **310**, 42-53.
23. CLOETENS (R.). — Identification de deux Phosphatases « alcalines » dans les organes animaux. *Enzymolog.*, 1939, **6**, 46.
24. CLOETENS (R.). — Aktivierung und Hemmung der alkalischen Phosphatasen. *Naturw.*, 1939, **27**, 806 ; c. c., 1940, **1**, 392.
25. CLOETENS (R.). — Préparation et propriétés de la phosphatase alcaline I. *Enzymolog.*, 1939, **7**, 157 et 333.
26. COURTOIS (J.). — Recherches sur les phosphatases végétales. *Thèse Doct. Sc. phys.*, Paris, 1938, 1 vol., Declume, éd., Lons-le-Saunier, 206 p.
27. COURTOIS (J.) et RABATTÉ. — Action du phlorhidzoïde et de quelques hétérosides voisins sur la phosphatase rénale. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 184.
28. CRUSE (J. E. J.) and ROSE (C. F. M.). — Determination of phosphatase in blood containing fluoride. *Brit. Journ. Exp. Path.*, 1936, **17**, 267.
29. DAVIES (D. R.). — The phosphatase activity of spleen extracts. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 529.
30. EHRENSVARD (G.). — Phosphatase. I. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1933.
31. ERDTMANN (H.). — Cité d'après FOLLEY et KAY [36].
32. ERDTMANN (H.). — Glycerophosphataspaltung durch Nierenphosphatase und ihre Aktivierung. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1927, **172**, 182.
33. ERDTMANN (H.). — Ueber Nierenphosphatase und ihre Aktivierung. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1928, **177**, 211.
34. EULER SVENSON. — Cité d'après OPPENHEIMER [70].
35. FLEURY (P.). — Les Diastases. Notions sur leur cinétique, leur constitution et leur mode d'action, pp. 83-105, in *Exposés de Biochimie médicale*, Masson et C^o, éd., Paris, 1939.
36. FOLLEY (S. J.) and KAY (H. D.). — The phosphatases, in *Ergebn. d. Enzymforsch.*, 1936, **5**, 159-212.
37. GIRI (K. V.). — Magnesium activation of tissue phosphatases. *Proc. Soc. Biol. Chem. India*, 1937, **2**, 10.
38. HOLMBERG (C. G.). — Ueber den Mechanismus bei der Mg-Aktivierung der Darmphosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1935, **279**, 145.
39. HOMMERBERG (CL.). — Spezifität der Phosphatasen. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1929, **185**, 123.
40. HORIL. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.) [70].

41. HOVE (E.), ELVEHJEM (C. A.) and HART (E. B.). — The effect of zinc on alkaline phosphatases. *Journ. of biol. Chem.*, 1940, **134**, 425.
42. INOUE (K.). — Wirkung der Chemikalien auf Glycerophosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1927, **7**, 433.
43. INOUE (K.). — Wirkung der Chemikalien auf Glycerophosphate. *Journ. of Biochem.*, 1928, **10**, 395.
44. JACOBSEN (E.). — Studien über die Stabilität und Trennbarkeit einiger Phosphatazen. *Biochem. Ztschr.*, 1933, **263**, 302.
45. JACOBSEN (E.). — Phosphathemmung der Nierenphosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1932-1933, **249**, 21 ; **267**, 89.
46. JENNER (H. D.) and KAY (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. III. Magnesium and the phosphatase system. *Journ. of biol. Chem.*, 1931, **93**, 733.
47. KAY (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. A. The quantitative distribution of phosphatases in certain mammalian tissues. *Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 855.
48. KAY (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. C. Synthetic activity of the phosphatase. *Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 861.
49. KEESER. — Cité d'après OPPENHEIMER [70].
50. KIESE-HASTINGS. — Cité d'après ALBERS [1].
51. KING (E. J.) and DELORY (G. E.). — Ascorbic acid and phosphatase activity. *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 1157.
52. KING (E. J.) and DELORY (G. E.). — A carbonate veronal buffer solution covering pH 7,5 to 10,7. *Enzymolog.*, 1940, **8**, 4, 278.
53. KLEIN (W.) and ROSSI (A.). — Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel. XXXVI. Fermentation Untersuchungen über den Aufbau des Polynucleotidmoleküls. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1935, **231**, 104.
54. KÖSTER (H.) und BERSIN (Th.). — Schweinenieren-phosphatase. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1935, **231**, 153.
55. KURATA (K.). — Ueber die fermentative Spaltung der Diphenylpyrophosphorsäure. *Journ. of Biochem.*, 1931, **14**, 25.
56. KÜTSCHER und WUST (H.). — Ueber die Fluoridhemmung der Phosphatase mit sauren Fluoridhemmung. *Biochem. Ztschr.*, 1942, **310**, 292.
57. KUWABARA (G.). — Einfluss des Ca auf Knorpelphosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1932, **16**, 403.
58. LATREILLE (M.). — Contribution à l'étude des phosphatases. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1938, 1 vol., Declume, éd., Lons-le-Saunier.
59. LOHMANN (K.). — Verhalten der Phosphatase in Gegenwart von Glutathion u Monojodessigsäure. *Biochem. Ztschr.*, 1933, **262**, 157.
60. LUNDGAARD. — Cité par COURTOIS et RABATTÉ [27].
61. MAG-VICAR. — Cité d'après FOLLEY et KAY [36].
62. MASSART (L.) und DUFAYT (R.). — Ueber die KCN und NaF Hemmung der Gärung mit besonderer Berücksichtigung der Metalle als Aktivatoren der Fermente. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1942, **272**, 157.
63. MASSART (L.) und DUFAYT (R.). — Fluoridhemmung und Metalaktivierung der Hefephosphatase. *Naturw.*, 1939, **27**, 806 ; c. c. 1940. **1**, 393.
64. MASSART (L.) und VANDENDRIESSCHE (L.). — Aktivierung und Hemmung der Phosphatasen. *Naturw.*, 1940, **28**, 143 ; c. c., 1940, **1**, 3405.

65. MICHAËLIS (L.). — Diethylbarbiturate buffer veronal buffer. *Journ. of biol. Chem.*, 1930, **87**, 34.
66. MINNITI (G.). — Untersuchung über die Aktivität der Pyrophosphatase in menschlichen fötus und sciuren adnexen. *Biochem. Therap. speriment.*, 1939, **26**, 417.
67. MORIL. — Cité d'après OPPENHEIMER [70].
68. MUNEMURA (S.). — Ueber den Einfluss der Elektrolyten auf die Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1933, **17**, 343.
69. OKAMURA. — Cité d'après LATREILLE [58].
70. OPPENHEIMER (C.). — Die Fermente und ihre Wirkungen. *Supplement, Lief. 1 et 2*, W. Junk, éd., La Haye, 1935, 98-170.
71. PYLE (J. J.), FISHER (J. H.), CLARK (R. H.). — Effect of physiologically important materials on kidney-phosphatase. *Journ. biol. Chem.*, 1937, **119**, 238.
72. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — Recherches sur l'ossification. VII. La phosphatase du squelette (os, dents, dermato-squelette) chez les Poissons osseux ou cartilagineux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 166.
73. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — Sur le système phosphatasique des hématies. *Enzymolog.*, 1939, **7**, 278.
74. ROCHE (J.) et COLLET (J.). — Recherches sur l'ossification. VIII. Activité phosphatasique des divers organes osseux au cours du développement chez la Sardine et rôle de la phosphatase dans la formation du squelette. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1940, **22**, 245.
75. ROCHE (J.), FILIPPI (A.) et LÉANDRI (A.). — Recherches sur l'ossification. III. La phosphatase des os longs aux diverses étapes de la croissance. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 1314.
76. ROCHE (J.) et LATREILLE (M.). — Sur la spécificité des phospho-estérases. Contribution à l'étude des phosphomonoestérases du foie et du rein. *Enzymolog.*, 1937, **3**, 75.
77. ROCHE (J.) et NGUYEN-VAN-THOAI. — Sur l'activation et l'inhibition des phosphatases par l'ion magnésium. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **14**, 847.
78. ROSSI (A.). — Ricerche sulla fosfatasi dell' osso. *Boll. Soc. ital. di Biol. sperim.*, 1933, **8**, 714.
79. SATOH (T.). — Ueber die Hydrolyse der Adenosintriphosphorsäure durch. Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1935, **21**, 19.
80. SCHÄFFNER (A.) und BAUER (E.). — Ueber den Einfluss von Sulfhydryl gruppen auf Phosphatase verschiedener Herkunft. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1934, **225**, 245.
81. SZENT-GYORGYI. — On protoplasmic structure and function. *Enzymolog.*, 1940, **9**, 98.
82. TAKAHASHI (H.). — Fermentative Dephosphorylierung der Nucleinsäure. *Journ. of Biochem.*, 1932, **16**, 463.
83. TAKAHASHI (H.). — Pyrophosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1932, **16**, 447.
84. TAKATA. — Cité d'après OPPENHEIMER [70].
85. TANNHÄUSER (S. J.), GRATTAN (S. F.), MADDOCK (S. J.) and RIECHEL (M.). — Studies on serum phosphatase activity. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, **121**, 697, 709, 715, 721, 727.
86. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.), WEIL (L.) und PURR (A.). — Ueber die Steuerung des intracellularen Umsatzes von Eiweiss und Kohlenhydrat durch Sulfhydryl. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1933, **215**, 64.

87. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.) und SCHÄFFNER (A.). — Cité d'après FOLLEY et KAY [36].
 88. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.), SCHARIKOWA (R.) und SCHÄFFNER (A.). — Ueber den Einfluss von Sulfhydrylverbindungen auf enzymatische Prozesse. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1933, **214**, 75.
 89. WILLIAM (H. L.) and WATSON (E. M.). — The influence of sulphhydryl compounds upon the activity of bone phosphatase in vitro. *Journ. of Biochem.*, 1940, **135**, 337.
 90. YAMANE (T.). — Ortho-und Pyrophosphatase des Knochens. *Arb. anat. Inst. Kaiserlichen Univ. Kyoto*, 1932, **3**, 35.
-

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER

Imprimé en France.

